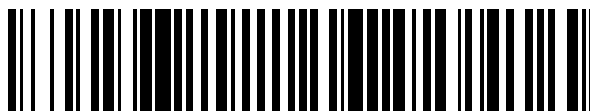


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 315**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 08735169 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2137314**

54 Título: **Nuevas moléculas moduladoras para un sistema de expresión regulado mejorado**

30 Prioridad:

**11.04.2007 US 907615 P**

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

**30.04.2013**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH  
(100.0%)  
Alfred-Nobel-Strasse 10  
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**BAUZON, MAXINE;  
DROESCHER, PETER;  
HARKINS, RICHARD, N.;  
HERMISTON, TERRY;  
KRETSCHMER, PETER;  
LEVITSKY, KONSTANTIN y  
SZYMANSKI, PAUL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 402 315 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

Nuevas moléculas moduladoras para un sistema de expresión regulado mejorado

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un sistema de expresión mejorado para la expresión regulada de una molécula terapéutica (MT) de proteína o ácido nucleico codificada, para su uso en el tratamiento de enfermedades. En particular, la presente invención se refiere a nuevas moléculas moduladoras para dichos sistemas de expresión génicos regulados mejorados y a composiciones farmacéuticas y a usos de las mismas para el tratamiento de enfermedades.

### Antecedentes de la invención

10 Se piensa que la administración de ácidos nucleicos que codifican moléculas terapéuticas (MT) para el tratamiento de enfermedades proporciona un enorme potencial como una modalidad terapéutica sobre los procedimientos de tratamiento convencionales. En particular, la administración de ácidos nucleicos que codifican una proteína terapéutica en terapia génica tiene la posibilidad de proporcionar ventajas significativas sobre terapias convencionales que requieren la administración de proteínas en embolada. Estas posibles ventajas incluyen, por  
15 ejemplo, la expresión prolongada y regulada de una MT en las células de un paciente dando como resultado una eficacia terapéutica máxima y efectos secundarios mínimos y también, la evitación de toxicidad e impurezas infecciosas y de impurezas sistémicas.

Por ejemplo, se sabe que la administración de proteínas en embolada para el tratamiento de enfermedades da como resultado efectos secundarios adversos incluyendo, por ejemplo, los relacionados con impurezas infecciosas y  
20 tóxicas, toxicidad sistémica, necrosis en el sitio de inyección, síntomas de tipo gripales, escalofríos, fiebre, fatiga, anorexia, y pérdida de peso. En algunos casos estos sucesos son limitadores de dosis y pueden conducir al cese del tratamiento en su conjunto. Además, se sabe que la exposición continua a algunas sustancias terapéuticas proteicas puede dar como resultado tolerancia a lo largo del tiempo. Por tanto, existe necesidad de un sistema de expresión regulado que pueda proporcionar un nivel prolongado o a largo plazo terapéuticamente eficaz de una MT con la  
25 característica adicional de un medio para reducir rápidamente o modular el nivel de MT dentro de una ventana terapéutica dinámica. Más particularmente, existe una necesidad de un sistema de expresión regulado que tenga la capacidad de desactivarse si la concentración de MT alcanzara un nivel que sea posiblemente tóxico. Adicionalmente, la capacidad de titular el nivel de MT permitiría dosificar para ajustar cuando existe una posibilidad de aumentar la tolerancia hacia la MT a lo largo del tiempo.

30 De particular interés y necesario es el suministro de un gen que codifique una proteína terapéutica que pueda expresarse en células diana de pacientes para remediar una afección resultante o producida por una enfermedad o detener o reducir la progresión de una enfermedad. Por ejemplo, las etiologías de muchas patologías son el resultado de la expresión de uno o más productos génicos defectuosos o el sistema defectuoso de uno o más  
35 productos génicos, por ejemplo, la expresión de una proteína mutada o la sobre o infra expresión de una proteína, respectivamente. Por lo tanto, los procedimientos de tratamiento convencionales incluyen la administración de proteínas recombinantes que corrijan dicha expresión de proteína defectiva o expresión de una proteína defectiva. Sin embargo, se sabe que la administración de agentes terapéuticos proteicos a un paciente da como resultado la generación de anticuerpos contra la proteína y su rechazo por el sistema inmunitario del paciente como extraño.

Por tanto, existe necesidad de una administración basada en genes de proteínas terapéuticas para el tratamiento de  
40 enfermedades que proporcione la expresión regulada prolongada de la proteína, dando como resultado la eficacia terapéutica al mismo tiempo que minimiza los efectos secundarios tóxicos limitantes de la dosis. Dicho sistema de expresión regulado impediría muchos de los principales factores limitantes asociados con los agentes terapéuticos proteicos actuales. Sin embargo, la mayoría de los sistemas de administración de ácidos nucleicos conocidos no son adecuados para el uso clínico y no consiguen una expresión regulada o prolongada en las células. Se ha descrito  
45 que únicamente unos pocos sistemas de administración de ácidos nucleicos conocidos tienen una capacidad de regular la expresión transgénica en condiciones de laboratorio pero la idoneidad y viabilidad de estos sistemas de administración para el uso clínico se desconocen (véase por ejemplo, Gossen, M. & Bujard H. (1995) Science 268: 1766-69; No, D. y col. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3346-51; Amara, J.F. y col. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10618-23; Wang, Y. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8180-84; Nordstrom, J. L. (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13: 453-58).

### Sumario de la invención

55 La presente divulgación proporciona un sistema de expresión mejorado para la expresión regulada de una proteína terapéutica o molécula terapéutica (MT) de ácido nucleico para su uso en el tratamiento de enfermedades, en el que la eficacia terapéutica de la MT puede maximizarse y los efectos secundarios minimizarse. En particular, la presente divulgación proporciona nuevas moléculas moduladoras, por ejemplo, nuevas moléculas activadoras (MA) moléculas inactivadoras (MI) y moléculas reguladoras (MR) para dicho sistema de expresión génico regulado mejorado y composiciones farmacéuticas y procedimientos de los mismos para el tratamiento de enfermedades.

- 5 En particular, la presente divulgación proporciona MA o MI que se unen selectivamente a una MR que tiene modificaciones que potencian esta selectividad. Por lo tanto, las nuevas MA y MI de la presente invención presentan propiedades mejoradas que se unen selectivamente o de otra manera interaccionan con una nueva MR de la presente invención, y disminuye o elimina la reactividad cruzada con proteínas endógenas, particularmente proteínas humanas endógenas, por ejemplo, un receptor, más particularmente un receptor de esteroides, e incluso más particularmente una RP o RG. En algunos aspectos, una nueva MA o MI de la presente divulgación un modulator de MR, particularmente un modulator receptor modificado, más particularmente un modulator de receptores de esteroides modificados, incluso más particularmente un modulator de RP o RG, por ejemplo un análogo del ligando de RP o RG.
- 10 En un aspecto, la MA o MI de la presente divulgación es un análogo de ligando de RP que se une selectivamente a una MR que tiene una LBD modificada o más particularmente una LBP modificada, y tiene efectos secundarios disminuidos o ninguno en relación con por ejemplo, reactividad cruzada con un RP endógeno y otros receptores de esteroides endógenos, la actividad abortiva, o actividad anticonceptiva.
- 15 Más particularmente, la presente divulgación proporciona nuevas MA, MI y MR que tienen propiedades mejoradas, incluyendo la capacidad de regular estrecha y específicamente el nivel de expresión de MT, de tal manera que la expresión de la MT puede modularse por ejemplo para aumentar o disminuir o activar y desactivar, MT. Cabe destacar, que las MA y MI de la presente divulgación tienen una selectividad mejorada para una MR de la presente divulgación. En algunos aspectos, la LBD y más particularmente la LBP de la MR se modifica para unirse a la MA o MI y/o es sensible a la MA o MI respectivamente, con una especificidad y selectividad mejoradas.
- 20 Por ejemplo, una MA de la presente divulgación puede ser, pero sin limitación, una MA que se une selectivamente a y/o active una MR, y tenga un escaso efecto o ninguno sobre una proteína endógena, por ejemplo, un receptor de esteroides endógeno. Además, por ejemplo, la MR de la presente invención puede ser, pero sin limitación, una MR que está modificada para unirse específicamente y/o de otra manera interaccionar con una MA y por lo tanto está activada por la MA. En algún aspecto, la MA se une o de otra manera interacciona con la MR y activa selectivamente la MR, de tal manera que la MR activada aumenta o activa la expresión de la MT. Por lo tanto, una MA y/o MR de la presente divulgación, proporciona la capacidad de regular estrecha y específicamente el nivel de la expresión y/o actividad de la MT. En algunos aspectos, la MA se une a una sola MR modificada para unirse selectivamente a la MA.
- 25 En algunos aspectos, una MI de la presente divulgación puede ser, pero sin limitación, una MI que se une selectivamente a y/o inactiva una MR, y tiene escaso o ningún efecto sobre una proteína endógena, por ejemplo, un receptor de esteroide endógeno. Además, por ejemplo, la MR de la presente invención puede ser, pero sin limitación, una MR que está modificada para unirse específicamente y/o de otra manera interaccionar con una MI y por lo tanto se inactiva por la MI. En algún aspecto, la MI se une o de otra manera interacciona con la MR e inactiva selectivamente la MR, de tal manera que la MR inactivada disminuye o desactiva la expresión de la MT. Por lo tanto, una MI y/o MR de la presente invención, proporciona la capacidad de regular estrecha y específicamente o modular el nivel de expresión de MT y/o actividad. En algunos aspectos, la MI se une a una sola MR modificada para unirse selectivamente a la MI. En aspectos preferidos, el dominio de unión a ligando (LBD), y más particularmente el bolsillo de unión a ligando (LBP) de la MR está modificado para unirse a la MA y/o es sensible a la MA, con una especificidad y selectividad mejoradas. Además en aspectos preferidos, la MA se une a una sola MR modificada para unirse selectivamente a la MA. Por ejemplo, una MA de la presente divulgación puede ser, pero sin limitación, una MA que se une selectivamente a y/o activa una MR, y tiene escaso o ningún efecto sobre una proteína endógena, por ejemplo, un receptor, más particularmente un receptor de esteroide e incluso más particularmente un RP o un RG. Además, por ejemplo, la MR de la presente invención puede ser, pero sin limitación, una MR que tiene un LBD receptor modificado, o más particularmente un LBP receptor modificado, que se une específicamente y/o de otra manera interacciona con una MA y por lo tanto está activado por la MA. En algún aspecto, la MA se une a o de otra manera interacciona con la MR y activa selectivamente la MR, de tal manera que la MR activada aumenta o activa la expresión de la MT. Por lo tanto, una MA y/o MR de la presente invención, proporciona la capacidad de regular estrecha y específicamente el nivel de expresión y/o actividad de la MT.
- 30 La MT codificada de la presente divulgación puede ser un ácido nucleico o una proteína que proporciona un beneficio terapéutico a un sujeto que tiene, o es susceptible a una enfermedad. Por ejemplo, dicho beneficio terapéutico o actividad incluye, pero sin limitación, la mejora, modulación, disminución, estabilización o prevención de una enfermedad o un síntoma de una enfermedad.
- 35 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un sistema de expresión regulado mejorado que comprende al menos un primer casete de expresión que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, de tal manera que, cuando se administra a las células de un sujeto, la MT codificada se expresa, y la expresión y/o actividad de la MT está regulada en presencia de una molécula reguladora (MR). Los ejemplos de dicha regulación incluyen, pero sin limitación, la inducción, la expresión, el aumento o la disminución de la expresión y/o actividad de la MT en presencia de una MR.
- 40 En un aspecto de la presente divulgación, la expresión y/o actividad de la MT está regulado de una manera sensible a la dosis o dependiente de la dosis, por ejemplo, de acuerdo con la cantidad de una MR presente en las células del
- 45
- 50
- 55
- 60

sujeto o administrarse al sujeto. En algunos aspectos, la expresión y/o actividad de la MT está regulada de una manera sensible a la dosis o dependiente de la dosis, por ejemplo, de acuerdo con la cantidad de una molécula activadora (MA) o molécula inactivadora (MI) presente en las células del sujeto o administradas al sujeto.

5 En otro aspecto de la presente divulgación, la expresión y/o actividad de la MT es dependiente de la orientación. Por ejemplo, en un aspecto, la expresión y/o actividad de la MT en células está modulada con respecto a la orientación de 5' a 3' del casete de expresión que codifica la MT, o con respecto a la orientación 5' a 3' de la transcripción o traducción de la MT codificada. Por consiguiente, la expresión y/o actividad de la MT puede modularse mediante la selección de una orientación particular del casete de expresión que codifica la MT o la orientación de la transcripción o traducción de la MT.

10 En otro aspecto, el sistema de expresión regulado de la presente divulgación comprende adicionalmente un segundo casete de expresión que codifica una MR, de tal manera, que cuando se administran a las células de un sujeto, la MR codificada se expresa y la presencia de la misma regula la expresión y/o actividad de la MT. En un aspecto preferido, un primer casete de expresión que codifica una MT y un segundo casete de expresión que codifica una MR de la presente invención están presentes en un solo vector. En un aspecto preferido, el vector único es pGT79.

15 En otro aspecto preferido, el vector único es pGT1003, pGT1004, pGT1005, pGT1006, pGT1007, pGT1008 o pGT1009. En otro aspecto aún preferido, el vector único es pGT1015, pGT1016, pGT1017, pGT1025, pGT1020, pGT1021, pGT1022, pGT1023 o pGT1024.

Una MT de la presente divulgación puede ser una ADN, ARN o proteína, o variantes de los mismos aislados codificados mediante una secuencia de ácido nucleico y tiene una actividad terapéutica. Más particularmente, una

20 MT de la presente invención puede ser un ADN, ARN o proteína recombinante, modificada o sintética. En otro aspecto de la presente divulgación, la MT codificada es un ácido nucleico, por ejemplo, un ADN o ARN, que tiene una actividad terapéutica. En un aspecto de la presente invención la MT codificada es un ARN, por ejemplo, un ARNip (ARN de interferencia pequeño) o ARNhc (ARN de horquilla corta). En otro aspecto de la presente divulgación la MT codificada es una proteína que tiene una actividad terapéutica y, preferentemente, una proteína

25 humana o una variante de la misma. En un aspecto la MT codificada es un anticuerpo monoclonal que tiene una actividad terapéutica. En un aspecto, la MT codificada es el anticuerpo monoclonal CAMPATH<sup>®</sup>. En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína es un gen o un fragmento génico. En un aspecto, la MT codificada es un factor estimulante de colonias de macrófagos/granulocitos (GM-CSF) o una variante de GM-CSF (por ejemplo, Leukine<sup>®</sup>). En otro aspecto, la MT codificada es un interferón, por ejemplo, un interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) o interferón beta (IFN- $\beta$ ) y más particularmente es IFN- $\beta$ -1a.

30

Una MR de la presente divulgación puede ser una molécula o una variante de la misma de origen natural, tal como una molécula modificada o una molécula aislada. En algunos aspectos, la MR de la presente invención es una molécula sintética o recombinante. Por ejemplo, en algunos aspectos, una MR de la presente invención es un compuesto químico, ADN, ARN o una proteína. Además, en algunos aspectos, una MR de la presente invención es una

35 molécula modificada. En un aspecto, la MR es una proteína humanizada. En algunos aspectos, la MR de la presente invención se modifica de tal manera que el LBD, y más particularmente el LBP, está mutado para aumentar la selectividad de la unión y/o interacción entre la MR y la MA o entre la MR y la MI.

En otro aspecto, la MR es una proteína humana o una variante de la misma que tiene una LBD receptor modificado y más particularmente un LBP receptor modificado, por ejemplo, un LBD receptor de esteroide modificado y más particularmente un LBD receptor de esteroide modificado. En algún aspecto, la MR tiene un LBD de RP o RG modificado y más particularmente un LBP de RP o RG modificado. En otro aspecto, la MR es un activador

40 transcripcional. En otro aspecto, la MR comprende un dominio de transactivación (por ejemplo, un dominio de transactivación VP16 o p65) o una parte de dicho dominio. En otro aspecto, la MR comprende un dominio de unión a ligando (LBD) o una parte de dicho dominio. Adicionalmente, en un aspecto, una MA se une al LBD o más particularmente al LBP de la MR, activando así la MR de tal manera que la presencia de la MR activada regula la

45 expresión y/o actividad de la MT. En otro aspecto, la MR comprende un DBD, por ejemplo, un DBD de GAL-4. En otro aspecto, la MR comprende un DBD que se une a una secuencia funcional (por ejemplo, una secuencia promotora), unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una MT, regulando de esta manera la expresión de la MT (por ejemplo, induciendo la expresión de la MT).

50 En otro aspecto, una MR de la presente divulgación está activada y por lo tanto la expresión y/o actividad de la MT está regulada en presencia de la MR activada. En un aspecto, una MR de la presente invención está expresada o está presente en células de un sujeto en una forma inactivada, y está activada en presencia de una MA, por lo tanto, la expresión y/o actividad de la MT está regulada por la MR activada. En un aspecto, la MA es un biomarcador. En un aspecto adicional, la MA es un biomarcador para una enfermedad o afección y, más particularmente, es un

55 biomarcador para una patología o afección, o síntomas de los mismos. En un aspecto, la MA activa la MR promoviendo o inhibiendo cambios conformacionales, procesamientos enzimáticos o modificación, unión específica o dimerización de la MR. En un aspecto preferido, la MA activa la MR promoviendo la homodimerización de la MR.

Una MA de la presente divulgación puede ser una molécula de origen natural o una variante de la misma, tal como una molécula modificada o una molécula aislada. En algunos aspectos la MA de la presente divulgación es una

60

molécula sintética o recombinante. Por ejemplo, en algunos aspectos, la MA de la presente divulgación es un compuesto químico, ADN, ARN o proteína. Adicionalmente, en algunos aspectos, la MA de la presente invención es una molécula modificada. En un aspecto, la MA es una proteína humanizada. En otro aspecto, la MA es una proteína humana o una variante de la misma. En aspectos preferidos, una MA de la presente invención se une selectivamente a y/o de otra manera interacciona con una sola MR o una MR específica, por ejemplo, una MR que tenga un LBD receptor modificado, y más particularmente un LBP receptor modificado que se une específicamente a la MA. Además en aspectos preferidos, una MA de la presente invención es un modulador de la MR, particularmente un modulador de receptor modificado, más particularmente un modulador de receptor de esteroide modificado incluso más particularmente un modulador de RP o RG modificado, incluso más particularmente un análogo del ligando de RP o RG e incluso aún más particularmente una antiprogestina modificada (por ejemplo una MFP modificada) o una mesoprogestina modificada (por ejemplo, un asoprisnil modificado). En otro aspecto, una MR de la presente divulgación está inactivada y por lo tanto la expresión y/o actividad de la MT está regulada en presencia de una MR inactivada. En un aspecto, una MR de la presente divulgación se expresa o está presente en células de un sujeto en una forma activada y se inactiva en presencia de una MI, por lo tanto, la expresión y/o actividad de la MT está regulada por la MR inactivada. En un aspecto, la MI es un biomarcador. En un aspecto adicional, la MI es un biomarcador para una enfermedad o afección y, más particularmente, es un biomarcador para una patología o afección, o síntoma de los mismos. En un aspecto, la MI inactiva la MR promoviendo o inhibiendo cambios conformacionales, procesamientos enzimáticos, unión específica o dimerización de la MR. En un aspecto preferido, la MI inactiva la MR inhibiendo la homodimerización de la MR.

Una MI de la presente divulgación puede ser una molécula de origen natural o una variante de la misma, o una molécula aislada. En algunos aspectos, la MI de la presente invención es una molécula sintética recombinante. Por ejemplo, en algunos aspectos, la MI de la presente divulgación es un compuesto químico, ADN, ARN o proteína. Adicionalmente, en algunos aspectos, la MI de la presente invención es una molécula modificada. En un aspecto, la MI es una proteína humanizada. En otro aspecto, la MI es una proteína humana o una variante de la misma. En aspectos preferidos, una MI de la presente invención se une selectivamente a y/o de otra manera interacciona con una sola MR o una MR específica, por ejemplo una MR que tenga un LBD receptor modificado y más particularmente un LBP receptor modificado que se une específicamente a la MI. Además, en aspectos preferidos, la MI es un modulador de MR, particularmente un modulador de receptor modificado, más particularmente un modulador de receptor de esteroides modificado, incluso más particularmente un modulador de RP o RG modificado, por ejemplo, un análogo de ligando de RP o RG, respectivamente.

La expresión de una MT, MR, MA o MI de la presente divulgación puede ser constitutiva o transitoria. En algunos aspectos, la expresión de una MT, MR, MA o MI está regulada o es específica de un tejido (por ejemplo específica de músculo). Los ejemplos de una MR regulada incluyen, pero sin limitación, una MR que está activada por una MA o inactivada por una MI. En un aspecto, la expresión de una MT, MR, MA, o MI de la presente invención está dirigida por un promotor regulado o un promotor específico de tejido. En un aspecto adicional, el promotor regulado o específico de tejido está regulado en presencia de una MR, y más particularmente, mediante la unión de la MR al promotor. Por ejemplo, en un aspecto, una MR de la presente invención se une a un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT y por lo tanto, regula la expresión de la MT codificada como se describe en el presente documento, en las células de un sujeto. En un aspecto, el promotor que está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica la MT, comprende al menos un sitio de unión al ADN (DBS) de GAL-4, y preferentemente comprende un DBS de GAL-4 3-18. En otro aspecto, el promotor es un promotor Pol II o Pol III. En otro aspecto, el promotor es el promotor Pol II U6H1. En otro aspecto, el promotor es un promotor Pol II seleccionado de un grupo que consiste en: un promotor de creatina quinasa de músculo (MCK), un promotor que comprende un elemento sensible a hipoxia (promotor HRE), un promotor de una molécula de adhesión de leucocito endotelial (ELAM), un promotor quimérico (por ejemplo el promotor quimérico de CMV/actina), promotor de ciclina A, promotor de cdc6.

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos para el tratamiento de una enfermedad o afección que comprende el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención como se describe en el presente documento. En aspectos particulares, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos para el tratamiento de una enfermedad o afección; la regulación de la expresión de una MT; la administración de una MT, el suministro de una MT o la expresión de una MT en células de un sujeto, en el que los procedimientos comprenden poner en contacto las células con un sistema de expresión regulado de la presente invención, de tal manera que la MT codificada se expresa en las células, y de tal manera que la expresión de la MT está regulada en presencia de una MR. En un aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos para el tratamiento de leucemia, melanoma, hepatitis y cardiomiopatía. En un aspecto preferido, la MT codificada del sistema de expresión regulado de la presente invención es un IFN, por ejemplo, un IFN- $\alpha$  o un IFN- $\beta$ , para el tratamiento de leucemia, melanoma, hepatitis o cardiomiopatía.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden al menos uno de los sistemas de expresión descritos en el presente documento, particularmente, al menos uno de la MT y MR de la presente invención, más particularmente, al menos uno de los vectores de la presente invención (por ejemplo, pGT79, pGT1003, pGT1004, pGT1005, pGT1006, pGT1007, pGT1008, pGT1009, pGT1015, pGT1016, pGT1017, pGT1025,

pGT1020, pGT1021, pGT1022, pGT1023 o pGT1024). En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden al menos una MA o MI de la presente divulgación. En un aspecto, una composición farmacéutica de la presente divulgación comprende uno o más vectores que codifican al menos una MT y/o MR. La MT, MR, MA y MI de la presente invención pueden administrarse a un sujeto por separado o juntas y *ex vivo* o *in vivo*, usando cualquier medio de administración adecuado descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Los ejemplos de dichos medios de administración adecuados incluyen, pero sin limitación inyección (por ejemplo inyección subcutánea), administración oral y electroporación. En un aspecto, una MT y MR de la presente divulgación están presentes en un solo vector, y se administran por separado a partir de una MA que activa la MR (y por lo tanto, la presencia de la MR activada regula la expresión y/o actividad de la MT). En un aspecto adicional, la MA es un compuesto (por ejemplo, un modulador de MR, particularmente un modulador de receptor modificado, más particularmente un modulador de receptor de esteroide modificado, incluso más particularmente un modulador de RP o RG modificado, incluso más particularmente un análogo de ligando de RP o RG e incluso aún más particularmente una antiprogestina modificada (por ejemplo una MFP modificada) o una mesoprogestina modificada (por ejemplo una asoprisnil modificado)) administrado por vía oral, y el vector único que codifica una MT y MR es un solo vector administrado mediante inyección o electroporación a las células de un sujeto (por ejemplo, células del músculo esquelético).

La presente divulgación proporciona adicionalmente vectores y kits que comprenden el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención. En algunos aspectos, el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención comprende uno o más vectores, y cada vector comprende uno o más casetes de expresión. En un aspecto, el sistema de expresión regulador mejorado de la presente invención comprende un solo vector que tiene al menos un casete de expresión y, más particularmente, al menos dos casetes de expresión. En un aspecto preferido, el sistema de expresión regulado mejorado de la presente divulgación comprende un solo vector que comprende un primer casete de expresión que tiene al menos un sitio de clonación para la inserción de una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, y un segundo casete de expresión que tiene al menos un sitio de clonación para la inserción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una MR. En otro aspecto, el vector es un vector que se usa para la producción de virus, por ejemplo, un plásmido lanzadera de virus adenoasociados (AAV), y más particularmente, un plásmido lanzadera AAV-1. En un aspecto, el vector de la presente invención es un vector no viral (es decir, un vector que no produce virus), por ejemplo un vector plasmídico que no produce virus. En un aspecto preferido, el vector es un vector plasmídico de la presente invención que comprende un sitio de clonación para la inserción de una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una MT. Los ejemplos de dichos vectores plasmídicos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, pGT79, pGT1003, pGT1004, pGT1005, pGT1006, pGT1007, pGT1008, pGT1009, pGT1015, pGT1016, pGT1017, pGT1025, pGT1020, pGT1021, pGT1022, pGT1023 o pGT1024.

Los casetes de expresión de la presente divulgación comprenden secuencias funcionales para la expresión de una molécula codificada de la presente invención, por ejemplo, una MT, una MR, una MA o MI. En algunos aspectos, el casete de expresión comprende al menos una secuencia funcional unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente divulgación. Los ejemplos de una secuencia funcional son, pero sin limitación, una región no traducida 5' o 3' (por ejemplo, UT12), un intrón (por ejemplo IVS8), un sitio poli(A) (por ejemplo el sitio poli(A) del SV40 o hGH), o un sitio de unión al ADN (DBS) (por ejemplo, DBS de GAL-4). En un aspecto, la secuencia funcional comprende al menos uno de DBS de GAL-4 y preferentemente comprende multímeros de un DBS de GAL-4 (por ejemplo DBS de GAL-4 3-18). Dichas secuencias funcionales también incluyen, por ejemplo, secuencias que codifican un promotor regulado o un promotor específico de tejido que promueve la expresión regulada o específica de tejido, respectivamente, de una molécula codificada por una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a dichas secuencias funcionales en un casete de expresión de la presente invención. En otro aspecto, los casetes de expresión de la presente divulgación comprenden al menos un sitio de clonación y, más preferentemente, un sitio de clonación múltiple (MCS), para la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención, por ejemplo, una MT, una MR, una MA o una MI.

En un aspecto, un primer casete de expresión de la presente divulgación comprende una MCS para la inserción de una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, un promotor inducible que comprende al menos un DBS (por ejemplo DBS de GAL-4 3-18), región no traducida 5' (por ejemplo, UT12), un intrón (por ejemplo IVS8), un sitio poli(A) de hGH de tal manera que cuando la primera secuencia de ácido nucleico se inserta en el MCS, estas secuencias funcionales están unidas operativamente a esta secuencia. En otro aspecto, un segundo casete de expresión de la presente divulgación comprende un MCS para la inserción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una MR regulada y un sitio poli(A) del SV40, de tal manera que cuando la segunda secuencia de ácido nucleico se inserta en el MSC, estas secuencias funcionales están unidas operativamente a esta secuencia. En un aspecto preferido, el primer y segundo casetes de expresión están presentes en un solo vector.

Los kits de la presente divulgación comprenden al menos uno de los sistemas de expresión de la presente divulgación descritos en el presente documento y, más particularmente, al menos una de las composiciones farmacéuticas, vectores o moléculas (por ejemplo MT, MR, MA o MI) de la presente divulgación e instrucciones para su uso.

**Breve descripción de los dibujos**

Todo lo anterior y otros objetos de la presente invención, sus diversas características así como la propia invención pueden comprenderse mejor a partir de la siguiente descripción, cuando se lee junto con los dibujos adjuntos en los que:

- 5 La **Figura 1** ilustra ejemplos no limitantes de un sistema de expresión regulado de la presente invención. La Figura 1A ilustra un ejemplo no limitante de un sistema de expresión regulado de la presente invención que comprende: 1) un primer casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica (MT) y una primera secuencia promotora que codifica un sitio de unión al ADN (DBS) y una secuencia TATA unida operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico; 2) un segundo casete de expresión que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula reguladora (MR) y una segunda secuencia promotora unida operativamente a la segunda secuencia de ácido nucleico; 3) la MR expresada que es una proteína de fusión o quimérica que comprende un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio de unión a ligando (LBD), y un dominio regulador (DR); y 4) una molécula activadora o inactivadora (MA/I) que activa la MR o inactiva la MR, respectivamente. En una realización, una molécula activadora (MA) se une a la MR y activa la MR y, por lo tanto, la MR activada se une al DBS de la secuencia promotora unida operativamente a la secuencia de MT dando como resultado la inducción de la expresión de MT en células (por ejemplo, células de mamífero). En otra realización, el primer y segundo casete de expresión está presente en un solo vector.
- 10 La **Figura 1B** ilustra un ejemplo no limitante de un sistema de expresión regulado de la presente invención que comprende: 1) un primer casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una MT y una primera secuencia promotora que codifica un DBS y una secuencia TATA unida operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico; 2) un segundo casete de expresión que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula reguladora (MR) y una segunda secuencia promotora unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico; 3) la MR expresada que es una proteína de fusión o quimérica que comprende un DBD, LBD, un dominio de activación (DA); y 4) una molécula activadora o inactivadora (MA/I). En una realización, una molécula activadora (MA) se une a la MR y activa la MR, y por lo tanto, la MR activada forma un homodímero que se une al DBS del promotor unido operativamente a la secuencia MT, dando como resultado la inducción de la expresión de la MT, en células, (por ejemplo, células de mamífero). En otra realización, el primer y segundo casetes de expresión están presentes en un solo vector.
- 15 La **Figura 2** ilustra vectores plasmídicos de IFN- $\gamma$  murino e IFN- $\gamma$  humano, para la generación de proteínas recombinantes. Las Figuras 2 A y B ilustran vectores de expresión de IFN- $\gamma$  para la generación de proteínas recombinantes (A, pGER90 (pCEP4/mIFN) y para estudios de administración basados en genes (B, pGER101 (pgWiz/mIFN)). El promotor del CMV y potenciador presentes en pGER90 se extiende desde -831 pb a +1 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción, sin UTR 5' o intrón. Las secuencias del CMV presentes en pGER101 incluyen el promotor, potenciador, UTR 5' e Intrón natural A de -674 pb a +942 pb. La Figura 2 C y D ilustran vectores de expresión de IFN- $\gamma$  para la generación de proteínas recombinantes (C, pGER123 (pCEP4/hIFN) y para estudios de administración basados en genes (D, pGER125 (pgWiz/hIFN)).
- 20 La **Figura 3** ilustra el perfil farmacocinético después de inyección de la proteína IFN- $\gamma$ -1a humana en ratones. A ratones C57Bl/6 se les administró 25 ng (Dosis Baja) o 250 ng (Dosis Alta) de la proteína hIFN- $\gamma$  1a recombinante mediante inyección i.v. o i.m. Los niveles de IFN- $\gamma$  humano se determinaron mediante ELISA (Toray-Fuji Bio, Biosource International) en muestras de suero obtenidas después de sangrado terminal de ratones en los momentos indicados postinyección (n=4 ratones por punto de tiempo). Cada punto de datos representa el valor medio +/- la desviación típica.
- 25 La **Figura 4** ilustra el perfil farmacocinético después de inyección intramuscular de AAV-1-hIFN- $\gamma$  en ratones. A ratones C57Bl/6 (n=6 por grupo) se les inyectó i.m. con  $0,5 \times 10^{10}$ ,  $1,0 \times 10^{10}$  o  $5,0 \times 10^{10}$  partículas virales de AAV-1-hIFN- $\gamma$ . Se extrajeron muestras de sangre en los puntos de tiempo indicados después de inyección y los niveles de suero de hIFN- $\gamma$  se determinaron por ELISA. Cada punto de datos representa el valor medio +/- la desviación típica.
- 30 La **Figura 5** ilustra la inducción de ARN Mx1 *in vitro* (en células L929) por mIFN- $\gamma$ . Células L929 se sembraron a  $5 \times 10^5$  células en placas de 6 pocillos y se estimularon con cantidades en aumento de proteína mIFN- $\gamma$  recombinante purificada. Cuatro horas después del tratamiento las células se recogieron, el ARN se aisló, y el ARN Mx1 se cuantificó mediante análisis TaqMan. La expresión del ARN Mx1 se representó gráficamente como el factor de aumento con respecto al ARN de GAPDH.
- 35 La **Figura 6** ilustra la inducción de ARN de Mx1 después de inyección i.v. (A) o i.m. (B) de la proteína mIFN- $\gamma$ . A ratones C57Bl/6 se les administraron 15, 150 o 500 ng de proteína mIFN- $\gamma$  recombinante purificada (actividad específica- $2,0 \times 10^8$  unidades/mg) mediante inyección i.v. (a través de la vena de la cola) o i.m. (n=3 ratones por grupo). A los puntos de tiempo especificados postinyección se extrajo sangre a los ratones y el ARN se aisló a partir de CMSP (células mononucleares de sangre periférica). El ARN Mx1 se midió mediante RT-PCR cuantitativa. El factor de aumento en cuanto al ARN Mx1 se expresó con respecto a valores de GAPDH medidos en las mismas muestras. Los controles incluían ratones sin tratar (N, *naïve*) y ratones inyectados con el tampón vehículo solamente, seguido de análisis Mx1 a las 2 horas (V2h) o 4 h (V4h) después de la inyección. Cada columna representa el valor medio +/- desviación típica.
- 40 La **Figura 7** ilustra niveles de inducción de IP-10 (A) y JE (B) después de inyección i.v. o i.m. de la proteína IFN- $\gamma$  murina. A ratones C57Bl/6 se les administró 15, 150 o 500 ng de proteína mIFN- $\gamma$  recombinante purificada

(actividad específica =  $2,0 \times 10^8$  unidades/mg) mediante inyección i.v. (a través de la vena de la cola) o i.m. (n=3 ratones por grupo). Se extrajo sangre a los ratones a 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas después de la inyección y los niveles de plasma de IP-10 y JE se midieron por ELISA (R&D Systems).

La **Figura 8** ilustra la inducción de IP-10 después de inyección intramuscular de ADN AAV-1-mIFN- $\gamma$  o ADN plasmídico mIFN- $\gamma$  con electroporación (EP) en ratones. A ratones normales (C57Bl/6) se les inyectó por i.m. AAV-1-mIFN- $\gamma$  ( $5 \times 10^9$  partículas virales) o ADN plasmídico mIFN- $\gamma$  (150 ug) con electroporación. A los ratones se les extrajo sangre en los puntos en el tiempo indicados y los niveles de IP-10 en plasma se determinaron mediante ELISA. Cada columna representa el valor medio +/- la desviación típica (n=5 ratones por grupo).

La **Figura 9** ilustra la inducción de ARNm Mx1 después de inyección intramuscular de ADN plasmídico mIFN- $\gamma$ . A los ratones se les inyectó i.m. en los músculos gastrocnemio y tibial de las patas traseras con cantidades diferentes de ADN plasmídico que codifica mIFN- $\gamma$  (62,5, 125, 250 o 500 ug) seguido por electroporación (n=5 por grupo). A los ratones se les extrajo sangre en momentos específicos después de la inyección, se aisló ARN a partir de CMSP, y la expresión de Mx1 se determinó mediante RT-PCR cuantitativa. Los niveles de ARN de Mx1 se normalizaron con respecto a la expresión de GAPDH y se muestran como un factor de inducción sobre el fondo medido el día 0 en comparación con los controles no tratados (Controles, n=4). Cada columna representa el valor medio +/- desviación típica.

La **Figura 10** ilustra la inducción de ARNm Mx1 después de inyección intramuscular de virus AAV-1-mIFN- $\gamma$  o ADN plasmídico mIFN- $\gamma$  con electroporación en ratones. A ratones normales (C57Bl/6) se les inyectó i.m. AAV-1-mIFN- $\gamma$  ( $5 \times 10^{10}$  partículas virales) o ADN plasmídico mIFN- $\gamma$  (150 ug) con electroporación. Los controles incluyeron ratones inyectados con PBS (control i.m.), y ratones inyectados con plásmido SEAP (pSEAP) o SEAP que expresa AAV-1 (AAV-SEAP). A los ratones se les extrajo sangre en los puntos en el tiempo indicados y los niveles de ARN Mx1 se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa en ARN aislado a partir de CMSP. La expresión de ARN Mx1 se normalizó con respecto a la expresión de GAPDH y se muestra como el factor de inducción sobre el fondo medido el día 0 en ratones de control inyectados con PBS. Cada columna representa el valor medio +/- la desviación típica (n=5 ratones por grupo).

La **Figura 11** ilustra la eficacia de la proteína IFN- $\gamma$  en un modelo de EAE agudo de ratón (como se describe en el Ejemplo 5 y en la subsección A de Materiales y Procedimientos). Ratones tratados con 100 K unidades de IFN- $\gamma$  desarrollaron unas puntuaciones clínicas significativamente disminuidas de EAE en comparación con ratones tratados con vehículo (p=0,0046). Ratones tratados con 30K unidades de IFN- $\gamma$  también desarrollaron puntuaciones clínicas disminuidas en comparación con los ratones tratados con vehículo, aunque esta disminución no alcanzó una significación estadística. Los controles positivos en este estudio, Mesopram y Prednisolona, también disminuyeron significativamente las puntuaciones clínicas.

La **Figura 12** ilustra la eficacia de la administración basada en genes de mIFN- $\gamma$  en un modelo de EAE agudo murino. Ratones SJL hembra se inmunizaron con la toxina PLP/tosferínica el día 1 como se describe por completo en el apartado Materiales y Procedimientos. Grupos de ratones (n=10 por grupo) se inyectaron bien con PBS, un plásmido vacío (pNull) más electroporación (EP) (pNull + EP, 120 ug) o bien con ADN plasmídico que codifica mIFN- $\gamma$  (pmIFN- $\gamma$ ) más EP (pmIFN- $\gamma$  + EP, 120 ug) el día 2 del estudio. Para la administración de la proteína, se administró la proteína mIFN- $\gamma$  recombinante (100.000 unidades) a otro grupo de animales mediante inyección s.c. un día sí y otro no comenzando el día 1 del estudio. Se observó una disminución significativa en la gravedad de la enfermedad con pmIFN- $\gamma$ +EP frente al grupo de control con pNull+EP (p=0,0171). Los resultados del estudio se describen por completo en Materiales y Procedimientos.

La **Figura 13** ilustra la eficacia de la proteína IFN- $\gamma$  en un modelo de EAE agudo de ratón como se describe en su totalidad en el Ejemplo 5 y en Materiales y Procedimientos.

La **Figura 14** ilustra vectores plasmídicos pGT1, pGT2, pGT3 y pGT4 (A, B, C, D, respectivamente), que son ejemplos no limitantes de los vectores de expresión regulados en un plásmido de la presente invención. En estos ejemplos, los vectores de expresión regulados de la presente invención contienen, en un solo vector plasmídico: 1) un primer casete de expresión con un sitio de clonación múltiple (MCS) para la inserción de un ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica (MT); y 2) un segundo casete de expresión con un sitio de clonación para la inserción de un ácido nucleico que codifica una molécula reguladora (MR). Cada uno de estos cuatro vectores proporciona una orientación diferente del primer y segundo casete de expresión con respecto al resto como se describe y se ilustra. En el primer casete de expresión, el promotor muscular esquelético (pro actina de m.e.), la región 12 no traducida (UT12), la secuencia intermedia 12 (IV8) del plásmido pLC1674 se localizan cadena arriba del MSC y del sitio poli (A) de la hormona de crecimiento humano (hGH poliA). En el MCS puede insertarse un ácido nucleico que comprenda una molécula terapéutica (MT) de interés, por ejemplo, un transgén.

La **Figura 15** ilustra ejemplos no limitantes de vectores plasmídicos de expresión regulados de la presente invención para la administración basada en genes de IFN- $\gamma$  murina (pGT23, pGT24, pGT25 y pGT26) (A), o IFN- $\gamma$  humana (pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30) (B). En estos ejemplos los vectores de expresión regulados de la presente invención contienen, en un solo vector plasmídico: 1) un primer casete de expresión con un sitio de clonación múltiple (MCS) y un ácido nucleico insertado en el MCS que codifica bien un gen IFN- $\gamma$  humano o un gen IFN- $\gamma$  murino; y 2) un segundo casete de expresión con un sitio de clonación y un ácido nucleico insertado en el sitio que codifica una molécula reguladora (MR) que contiene el LBD modificado del receptor de progesterona (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos que de la SEC ID N°: 22 o codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 21). Cada uno de estos vectores proporciona una orientación diferente del primer y segundo casete de expresión con respecto al resto como se describe y se ilustra en su totalidad en Materiales y Procedimientos, subsección F.



La **Figura 16** ilustra la validación *in vitro* de los vectores plasmídicos de expresión regulados por hIFN- $\gamma$  de la presente invención en células musculares esqueléticas murinas como se describe en su totalidad en el Ejemplo 6, subsección C. Los vectores plasmídicos constitutivo (pGER125) e inducible (pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30) se transfectaron en células C2C12 musculares de ratón tratadas con MFP (10 nM) y se recogieron los medios. Los medios se sometieron a ensayo para determinar la hIFN- $\gamma$  por ELISA. Se muestra la media de dos transfecciones independientes. Los vectores plasmídicos pGS1694 + pGER129 es un sistema de dos plásmidos de Valentis en el que los autores de la presente invención insertan el gen hIFN- $\gamma$ . Los vectores de expresión regulados de la presente invención se construyeron con el gen hIFN- $\gamma$  en dirección directa (hIFN,  $\gamma$ ) o inversa (hIFN $\gamma$ ,  $\gamma$ ), cadena arriba o cadena abajo del casete MR.

La **Figura 17** ilustra la validación *in vitro* de los vectores plasmídicos de expresión regulados por mIFN- $\gamma$  de la presente invención en células musculares esqueléticas murinas como se describe por completo en el Ejemplo 6, subsección C. Los plásmidos de expresión constitutivos (pGER101) e inducible (pGT23, pGT24, pGT25 y pGT26) se transfectaron en células C2C12 musculares de ratón. 24 horas (h) después de la transfección el medio se sustituyó por medio recién preparado sin o con MFP (10 nM). Los medios se recogieron 24 h después y se ensayaron para detectar la presencia de mIFN- $\gamma$  mediante un ensayo con genes indicadores. El cuadro demuestra la media de tres transfecciones independientes. pGS1694 + pGER127 es un sistema de dos plásmidos de Valentis en el que los autores de la presente invención insertaron el gen mIFN- $\gamma$ . Los vectores de expresión regulados de la presente invención se construyeron con el gen mIFN- $\gamma$  en dirección directa (mIFN,  $\gamma$ ) o inversa (mIFN $\gamma$ ,  $\gamma$ ), cadena arriba o cadena abajo del casete de MR.

La **Figura 18** ilustra la inducción de ARN Mx1 *in vivo* usando un sistema de expresión regulado por pBRES-1 mIFN- $\gamma$  de la presente invención. La expresión constitutiva (pGER101) e inducible regulada (pGT26) de los vectores plasmídicos mIFN- $\gamma$  se inyectaron y se sometieron a electroporación en los músculos tibial y gastrocnemio de ratones (150  $\mu$ g por animal). Se extrajo sangre 7 días después de la inyección. Los ratones se trataron con MFP (0,33 mg/kg) mediante sonda oral una vez al día 7-10 días después de la inyección. Se extrajo sangre los días 11 y 18 después de la inyección. Se aislaron CMSP de la sangre y el ARN se preparó a partir de las CMSP y se sometió a ensayo mediante RT-PCR para determinar el nivel de ARN Mx1. Los niveles de expresión de Mx1 se normalizaron con respecto a GAPDH. Los resultados se muestran como media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica y muestran escasa o ninguna actividad de ARN Mx1 usando pBRES-1 -mIFN en ausencia de MFP a los 7 días y una fuerte inducción a niveles mayores que con CMV-mIFN en presencia de MFP a los 11 días, como se describe en su totalidad en Materiales y Procedimientos, subsección C. A los 18 días, en ausencia de MFP, el ARN Mx1 disminuyó casi hasta los límites basales.

La **Figura 19** ilustra la inducción de IP-10 y JE con un sistema de expresión regulado por pBRES-1 mIFN- $\gamma$  de la presente invención. Los plásmidos de expresión constitutivo (pGER101) e inducible pBRES-1 (pGT26) mIFN se inyectaron y se electroporaron en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A los animales se les extrajo sangre y el plasma se sometió a ensayo para detectar las quimiocinas IP-10 y JE mediante ELISA el día 7 (ausencia de MFP), el día 11 (después de cuatro días consecutivos de administración oral de MFP) y el día 18. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica, y presentan escasa o ninguna actividad de quimiocinas (IP-10 y JE) usando pBRES-1-mIFN en ausencia de MFP a los 7 días, y una fuerte inducción a niveles más altos que con CMV-mIFN en presencia de MFP a los 11 días, como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección C. A los 18 días, en ausencia de MFP, los niveles de quimiocina volvieron a niveles basales.

La **Figura 20** ilustra vectores plasmídicos pbSER189 (A) y pgWIZ (B) usados en la construcción del vector plasmídico pGER (pgWiz/mIFN) (C), como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 21** ilustra el vector plasmídico pGER125 (pgWiz/hIFN) como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 22** ilustra el vector plasmídico pGene/V5-HisA como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 23** ilustra el vector plasmídico pGene-mIFN (pGER127) como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 24** ilustra el vector plasmídico pGene-hIFN (pGER129) como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 25** ilustra el vector plasmídico pSwitch (Invitrogen) como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 26** ilustra el vector plasmídico pGS1694 como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 27** ilustra el vector plasmídico pLC1674 como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 28** ilustra los plásmidos lanzadera pGT-hGMCSF y pGT-mGMCSF y sus construcciones como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 29** ilustra los plásmidos lanzadera pZac2.1-MR-hGMCSF y pZac2.1-MR-mGMCSF (A) y pZac2.1-CMV-hGMCSF (pGT713) y pZac2.1-CMV-mGMCSF (pGT714) (B) y sus construcciones como se describe por completo en Materiales y Procedimientos, subsección F.

La **Figura 30** ilustra los pORF-hGMCSF y pORF9-mGMCSF usados en la construcción de pZac2.1-MR-hGMCSF y pZac2.1-MR-mGMCSF, respectivamente, como se describe por completo en Materiales y Procedimientos subsección F.

La **Figura 31** ilustra los plásmidos lanzadera pGT715 (A) y pGT716 (B), como se describe por completo en Materiales y Procedimientos subsección F.

La **Figura 32** ilustra la inducción de IP-10 *in vivo* con los vectores plasmídicos de expresión regulados por mIFN- $\gamma$  de la presente invención. Los plásmidos de expresión de mIFN- $\gamma$  inducibles (pGT23, pGT24, pGT25 y pGT26) se inyectaron y electroporaron en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A los animales se les extrajo sangre y el suero se sometió a ensayo para detectar la quimiocina IP-10 mediante ELISA el día 7 (ausencia de MFP), el día 11 (después de cuatro días consecutivos de administración oral de MFP) y el día 18. Los resultados se muestran como media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica.

La **Figura 33** ilustra la inducción de hIFN *in vivo* con vectores plasmídicos de expresión regulados por hIFN- $\gamma$  de la presente invención. Los plásmidos de expresión hIFN- $\gamma$  constitutivos (pGER125) e inducibles (pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30) se inyectaron y electroporaron en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A los animales se les extrajo sangre y el suero se sometió a ensayo para detectar la hIFN por ELISA el día 7 (en ausencia de MFP), el día 11 (después de cuatro días consecutivos de administración oral de MFP) y el día 18. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica.

La **Figura 34A** ilustra la inducción de hEPO *in vivo* con los vectores plasmídicos de expresión regulados por hEPO de la presente invención. Dos plásmidos inducibles (pGS1694 + pEP1666) y un plásmido BRES-1 (pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30) y plásmidos de expresión hEPO se inyectaron y electroporaron en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A cinco animales de cada grupo se les administró MFP mediante inyección i.p. durante cuatro días consecutivos (7-10) y a todos se les extrajo sangre 6 h después de la última inyección de MFP. A los cinco animales restantes de cada grupo se les extrajo sangre el día 10 en ausencia de tratamiento con MFP. El suero se sometió a ensayo para determinar hEPO por ELISA. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica.

La **Figura 34B** ilustra la inducción de un recuento de hematocrito *in vivo* con vectores plasmídicos de expresión regulados por hEPO de la presente invención. Los plásmidos de expresión hEPO, dos plásmidos inducibles (pGS1694 + pEP1666) y un plásmido BRES-1 (pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30) se inyectaron y electroporaron en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6 y los animales se trataron con MFP o se dejaron sin tratar y se extrajo sangre como se ha indicado anteriormente. La sangre se coaguló y se centrifugó en tubos microcapilares y se midió el porcentaje de eritrocitos (RBC, células sanguíneas rojas). Los resultados se muestran como media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica.

La **Figura 35** ilustra inducciones de hIFN múltiples, persistentes, prolongadas *in vivo* con un vector AAV de expresión regulado por hIFN- $\gamma$  de la presente invención. El vector AAV de expresión de hIFN- $\gamma$  inducible AAV-1-GT58 se inyectó en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A los animales se les extrajo sangre y el suero se sometió a ensayo para determinar la hIFN por ELISA en ausencia o presencia de MFP (cuatro días consecutivos de inyecciones i.p.) como se ha indicado. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica.

La **Figura 36** ilustra inducciones de IP-10 múltiples, persistentes, prolongadas en respuesta a dosificaciones en aumento de MFP *in vivo* con administraciones repetidas de un vector plasmídico de expresión regulado por mIFN- $\gamma$  de la presente invención. El plásmido de expresión de mIFN- $\gamma$  inducible pGT26 se inyectó y electroporó el día 0 en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A los animales se les administró MFP a diversas concentraciones mediante inyección i.p. durante cuatro días consecutivos (día 7-10 y 63-66) y después se les extrajo sangre al siguiente día (día 11 y 67). El ADN plasmídico se reinyectó el día 77 y 189. Los tratamientos con MFP después de la reinyección con plásmido fueron el día 84-87 y 196-199, respectivamente. Se extrajo sangre el día 88 y 200, respectivamente. El suero se sometió a ensayo para detectar la quimiocina IP-10 por ELISA. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo).

La **Figura 37A** ilustra la cinética de inducción de hIFN *in vivo* con un vector AAV de expresión regulado por hIFN- $\gamma$  de la presente invención. El vector AAV de expresión de hIFN- $\gamma$  inducible AAV-1GT58 se inyectó en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A los animales se les administró MFP por inyección i.p. durante cuatro días consecutivos y después se les extrajo sangre a diversos tiempos después de la primera inyección de MFP como se indica en el gráfico. El suero se sometió a ensayo para detectar hIFN por ELISA. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica.

La **Figura 37B** ilustra la cinética de la des-inducción de hIFN *in vivo* con un vector AAV de expresión regulado por hIFN- $\gamma$  de la presente invención. El vector AAV de expresión de hIFN- $\gamma$  inducible AAV-1GT58 se inyectó en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6. A los animales se les administró MFP por inyección i.p. durante cuatro días consecutivos y después se les extrajo sangre a diversos momentos después de la última inyección con MFP como se indica en el gráfico. El suero se sometió a ensayo para detectar hIFN por ELISA. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo) +/- la desviación típica.

La **Figura 37C** ilustra la cinética de la inducción y des-inducción de mIFN, respuesta a tratamiento pulsátil o crónico con MFP y la persistencia de la expresión génica a lo largo de varios meses con el vector plasmídico de expresión regulado por mIFN- $\gamma$  de la presente invención. Los plásmidos de expresión de mIFN constitutivos (pGER101, CMV) e inducible (BRES-1, pGT26) se inyectaron con electroporación en los músculos de las patas traseras de ratones y a los animales se les extrajo sangre a diversos puntos en el tiempo antes, durante y/o después del tratamiento con MFP como se indica en el gráfico. El suero se sometió a ensayo para detectar la quimiocina IP-10 mediante ELISA. Los resultados se muestran como la media (n=5 animales por grupo).

La **Figura 38** ilustra la inducción de Mx-1 *in vivo* con un vector plasmídico de expresión regulado por mIFN- $\gamma$  de la presente invención. El plásmido de expresión de mIFN- $\gamma$  inducible pBRES-1 mIFN (pGT26) o el plásmido pBRES-1 Null-MFP (control) se inyectó y electroporó en los músculos de las patas traseras de ratones SJL con

EAE aguda. Los ratones se trataron con MFP (0,33 mg/kg) mediante inyección i.p. una vez al día (d) o cada tres días (ctd) después de la inyección con el plásmido. Se extrajo sangre al 5º día después de la inyección. Se aislaron CMSP de la sangre y el ARN se preparó a partir de las mismas y se ensayó mediante RT-PCR para determinar el nivel de ARN de Mx1. Los niveles de expresión de Mx1 se normalizaron con respecto a GAPDH.

Los resultados se muestran como la media +/- la desviación típica. La **Figura 39** ilustra un sistema de expresión regulado que combina la Molécula Reguladora (MR) y la Molécula Terapéutica (MT) o el gen indicador en un solo plásmido. Son posibles cuatro orientaciones diferentes de MR y MT/gen indicador. Como ejemplo se muestra la orientación de pGT79.

La **Figura 40** proporciona una vista global de la activación del sistema de expresión regulado de la presente invención. La MA se une a la MR e induce su dimerización y translocación en el núcleo. El complejo MA/MR así formado se une al promotor regulado y activa la transcripción de la MT o del gen indicador.

La **Figura 41** ilustra la inducción de la expresión de luciferasa por ocho compuestos que se ha identificado en la exploración dirigida (véase Ejemplos 10 y 11) que presentan cambios conservativos en su estructura y conservan estructura de tipo antiprogestina similar a más compuestos antiprogestina potentes. Se transfectaron temporalmente células 3T3 NIH de fibroblasto murino con el plásmido pBRES-Luc. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con MFP o un compuesto de ensayo a concentraciones de 1, 10 y 100 nM. Después de 24 horas de tratamiento, el grado de activación de MR se determinó midiendo la cantidad de indicador luciferasa expresado.

La **Figura 42** ilustra la inhibición de la actividad del receptor de progesterona por ocho compuestos que se ha identificado en la exploración dirigida que presentan cambios conservativos en su estructura y conservan la estructura de tipo antiprogestina similar a más compuestos de antiprogestina potentes. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se dejaron unirse durante una noche. El medio de crecimiento que contenía FBS al 10 % se cambió por un medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al siguiente día, las células se trataron con MFP o compuestos de ensayo a concentraciones de 0,1, 1 y 10 nM durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, un agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad de AP en lisados de células tratadas se midió mediante su capacidad para hidrolizar el para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG para la unión con RP e inhiben la expresión de AP en células T47D. El grado de esta inhibición está presente como inhibición en porcentaje con compuestos más potentes (tales como MFP) capaces de inhibir el 100 % de la expresión de AP dependiente de RP.

La **Figura 43** proporciona las estructuras de A) compuesto BLX-913 seleccionado para estrategia de mutagénesis guiada estructural; B) candidato clínico avanzado Asoprisnil; C) antiprogestina aprobada clínicamente Mifepristona; D) Progesterona. La similitud entre las estructuras de BLX-913 y Asoprisnil sugiere una fuerte correlación entre los datos de seguridad para Asoprisnil y los de BLX913.

La **Figura 44** ilustra la inhibición de la actividad Fosfatasa Alcalina (AP) inducida por RP por la antiprogestina potente Mifepristona (MFP) y el nuevo compuesto candidato de Molécula Activadora BLX-913. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se dejó que se uniesen durante una noche. El medio de cultivo que contenía FBS al 10 % se cambió por medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al día siguiente, las células se trataron con MFP o BLX-913 durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, un agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad AP en lisados de células tratadas se mide mediante su capacidad para hidrolizar para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG por la unión a RP e inhiben la expresión de AP en células T47D, dando como resultado una tasa disminuida de la actividad de AP a mayores concentraciones de antiprogestina.

La **Figura 45** proporciona una vista estereo del modelo de homología de LBD MR en complejo con MFP basándose en la estructura cristalina de rayos X del RG en complejo con MFP (1NHZ.pdb).

La **Figura 46** proporciona una imagen en estereo del modelo predicho de BLX-913 unido a LBP de LBD de MR. Los conflictos entre el sustituyente 11β-benzaldoximina de BLX-913 y la cadena lateral del Triptófano 755 de MR se muestran con líneas discontinuas.

La **Figura 47** ilustra la activación mejorada de la MR mutante W755A mediante BLX-913 en comparación con la activación de la proteína MR original. Se transfectaron temporalmente Células Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) con plásmidos pBRES-Luc que portaban mutaciones en la posición 719 o 755 junto con la construcción wt-pBRES (pGT79). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos y al día siguiente se trataron con el compuesto BLX-913 a concentraciones de 1, 10 y 100 nM. Después de las 24 horas de tratamiento se determinó el grado de activación de MR midiendo la cantidad de indicador luciferasa expresada.

La **Figura 48** ilustra la activación mejorada de la MR mutante V729L/W755A mediante BLX-913 en comparación con la activación de la proteína MR original. Células Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) se transfectaron temporalmente con plásmidos pBRES-Luc que portaban mutaciones en la posición 729 y/o 755 junto con la construcción wt-pBRES (pGT79). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos y al día siguiente se trataron con el compuesto BLX-913 a concentraciones de 1, 10 y 100 nM. Después de 24 horas de tratamiento se determinó el grado de activación de MR midiendo la cantidad de indicador luciferasa expresada.

La **Figura 49** ilustra la respuesta a la dosis de mutantes de MR a la BLX-913. Las Células Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) se transfectaron temporalmente con plásmidos pBRES-Luc que llevaban

mutaciones en la posición 729 y/o 755 junto con la construcción wt-pBRES (pGT79). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos y al siguiente día se trataron con el compuesto BLX-913 a concentraciones de hasta 1  $\mu$ M. Después de 24 horas de tratamiento se determinó el grado de activación de MR midiendo la cantidad del indicador luciferasa expresado.

La **Figura 50** ilustra el efecto de mutaciones de LBD sobre el nivel de proteína MR. Se muestra el nivel de proteína MR expresado a partir de construcciones pBRES de tipo natural (pGT79) (Carril 1), W755A (pGT1009) (Carril 2) y V729L/W755A (pGT1017) (Carril 3) en células HEK 293. Se disolvieron las mismas cantidades de lisados celulares que expresaban cada una de las proteínas MR sobre SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron sobre la transferencia de Western usando el anticuerpo anti-NF- $\kappa$ B p65 de conejo (1:200, Santa Cruz, sc-372), que reconoce la proteína p65 endógena (65 kDa) en las células HEK 293 y la proteína MR (70 kDa).

La **Figura 51** proporciona las estructuras de cuatro análogos de MFP con modificaciones en las posiciones 15 y 16.

La **Figura 52** ilustra la inhibición de la actividad del receptor de Progesterona mediante cuatro análogos de MFP con modificaciones en las posiciones 15 y 16. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se dejaron unirse durante una noche. El medio de crecimiento que contenía FBS al 10 % se cambió por medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al día siguiente, las células se trataron con MFP o compuestos de ensayo a concentraciones de 0,1, 1 y 5 nM durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, una agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad AP en lisados de células tratadas se midió mediante su capacidad para hidrolizar el para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG para unirse a RP e inhiben la expresión de AP en células T47D. El grado de esta inhibición se presenta como un porcentaje de inhibición con compuestos más potentes (tales como MFP) capaces de inhibir el 100 % de la expresión de AP dependiente de RP.

La **Figura 53** proporciona las estructuras de MFP y análogos de Asoprisnil con modificaciones en las posiciones 4 y 7.

La **Figura 54** ilustra la inhibición de la actividad del receptor de Progesterona por análogos de MFP con modificaciones en las posiciones 4 y 7. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se dejaron unirse durante una noche. El medio de crecimiento que contenía FBS al 10 % se cambió por medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al día siguiente, las células se trataron con MFP o compuestos de ensayo a concentraciones de 1, 10 y 100 nM durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, un agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad AP en lisados de células tratadas se midió mediante la capacidad de hidrolizar para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG para unirse al RP e inhiben la expresión de AP en células T47D. El grado de esta inhibición se presenta como porcentaje de inhibición con compuestos más potentes (tales como MFP) capaces de inhibir el 100 % de la expresión de AP dependiente de RP.

La **Figura 55** ilustra una realización ejemplar y no limitante del sistema de expresión pBRES. En esta realización, la unión de MFP a MR activa la MR y da como resultado la expresión posterior de la MT a partir del sistema de expresión pBRES. La MFP es un antagonista conocido de diversos receptores esteroideos humanos endógenos, que pueden dar como resultado posiblemente efectos secundarios no deseados.

La **Figura 56** ilustra una estrategia ejemplar no limitante para explorar nuevas moléculas activadoras y reguladoras. **(1)** Se identificaron nuevas MA a partir de una exploración directa de análogos del ligando de RP que no interactúan con el RP humano endógeno debido a la presencia de perturbaciones estéricas o iónicas del compuesto. **(2)** Se usa mutagénesis guiada por modelación para introducir mutaciones compensatorias en el LBP de la MR, creando de esta manera moléculas de MR modificadas por ingeniería genética. **(3)** La nueva MA se usa junto con la MR modificada por ingeniería genética para producir un complejo activo MA-MR con propiedades mejoradas, por ejemplo regulación específica y estrecha de expresión de MT y una disminución o mejora de efectos secundarios no deseados o reacción cruzada con proteínas endógenas, particularmente proteínas humanas endógenas, por ejemplo, receptores esteroideos humanos endógenos. Esta estrategia ejemplar y no limitante también puede usarse para explorar nuevas moléculas inactivadoras.

La **Figura 57** ilustra una estrategia ejemplar y no limitante para desarrollar un complejo MA-MR altamente selectivo usando SAR a partir de uno o más pares MA-MR moderadamente selectivos. **(1)** La MA1 nueva se identifica usando la estrategia indicada en la Figura 57 y se instalan mutaciones compensatorias en la región 1 dentro del LBP o la MR para crear un complejo MA1-MR1 moderadamente selectivo. **(2)** Se identifica una nueva MA2 usando la estrategia indicada en la Fig. 57 y se realizan mutaciones compensatorias en la región 2 dentro del LBP de la MR para crear un complejo MA2-MR2 moderadamente selectivo. **(3)** Usando síntesis química, se combinan modificaciones que imparten selectividad de MA1 y MA2 en un compuesto, MA3. Las mutaciones compensatorias en las regiones 1 y 2 dentro del LBP se combinan dentro de una sola construcción MR3 usando mutagénesis dirigida. Aprovechándose de dos o más características que imparten selectividad, la MA3 se usa junto con la MR3 para producir un complejo MA-MR con una mayor selectividad en comparación con MA1 o MA2. Esta estrategia ejemplar y no limitante también puede usarse para desarrollar un complejo MI-MR altamente selectivo.

La **Figura 58** muestra la inducción de la expresión de luciferasa a partir de pBRES con RP wt (de tipo natural) o V729L/W755A (\*) en células musculares de ratón C2C12. Se muestran las orientaciones de los genes de RP (flecha blanca) y mSEAP (flecha negra) dentro de cada construcción.

La **Figura 59** muestra la inducción de la expresión de mSEAP a partir de pBRES con RP wt (de tipo natural) o

V729L/W755A (\*) en células musculares de ratón C2C12. Se muestran las orientaciones de los genes de RP (flecha blanca) y mSEAP (flecha negra) dentro de cada construcción.

La **Figura 60** muestra la inducción de la expresión de hIFN $\beta$  a partir de pBRES con RP wt (de tipo natural) o V729L/W755A (\*) en células musculares de ratón C2C12. Se muestran las orientaciones de los genes de RP (flecha blanca) y hIFN $\beta$  (flecha negra) dentro de cada construcción.

La **Figura 61** muestra los resultados de ensayo *in vivo* del sistema BLX-913/RP modificado por ingeniería genética.

### **Descripción detallada de la invención**

Las referencias citadas en el presente documento, incluyendo por ejemplo patentes, solicitudes de patente, revistas, libros y publicaciones de sitios Web se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

### **Abreviaturas**

	AAV (virus adenoasociado)
	AAV-1 (virus adenoasociado, serotipo 1)
	AAV-2 (virus adenoasociado, serotipo 2)
15	MA (molécula activadora)
	AMP (ampicilina)
	pb (pares de bases)
	BRES-1 (Sistema de Expresión Regulado por Berlex 1)
	BGH (hormona del crecimiento bovino)
20	CMV (citomegalovirus)
	DBD (dominio de unión al ADN)
	ADN (ácido desoxirribonucleico)
	EAE (Encefalomiелitis Alérgica Experimental)
	pot (potenciador)
25	TATA E1b (caja TATA promotora del gen E1 b de Adenovirus)
	EBNA-1 (Antígeno Nuclear del virus de Epstein-Barr)
	EDTA (ácido etilén diamino tetraacético)
	EF-1 $\alpha$ (factor de elongación-1alfa)
30	ELAM (molécula de adhesión leucocitaria endotelial)
	ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)
	EP (electroporación)
	EPO (eritropoyetina)
	GAL-4 (proteína GAL-4 de levadura)
	6x GAL-4 (seis copias del sitio de unión al ADN de GAL-4)
35	GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
	GMCSF (factor estimulante de granulocitos/macrófagos)
	hGMCSF (factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos humano)
	hIFN (interferón humano)
	hIFN- $\beta$ (interferón- $\beta$ humano)
40	h (hora)
	RH (receptor hormonal)
	HRE (elemento sensible a hipoxia)
	hGH (hormona de crecimiento humano)
	hPR (receptor de progesterona humano)
45	HTLV (virus linfotrópico de linfocitos T humano)
	HSV (virus del herpes simple)
	Higo (higromicina)
	IFN- $\beta$ (interferón- $\beta$ )
	IFN- $\beta$ 1a (interferón- $\beta$ 1a)
50	IFN $\beta$ 1b (interferón- $\beta$ 1b)
	sec señ IFN (secuencia señal de interferón)
	IgK (inmunoglobulina kappa)
	i.m. o IM (intramuscular)
	iny. (inyectada)
55	INR o inr (elemento iniciador de la transcripción)
	IP-10 o IP-10 (proteína 10 inducible por interferón-alfa)
	RTI (repeticiones terminales invertidas)
	i.p. o IP (intraperitoneal)
	IVS8 (secuencia intermedia o intrón 8)
60	i.v. o IV (intravenoso)
	JE (análogo murino de MCP-1)
	kDA (kilodalton)

	kan (kanamicina)
	KanR (gen de resistencia a Kanamicina)
	LBD (dominio de unión a ligando)
	LBP (bolsillo de unión a ligando)
5	MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos)
	MCS (sitio de clonación múltiple)
	MFP (mifepristona)
	mg (miligramo)
10	mGMCSF (factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos de ratón)
	mIFN (interferón murino)
	mIFN- $\beta$ (interferón-beta murino)
	ml (mililitro)
	min (minutos)
15	MCK (creatina quinasa de músculo)
	Mx1 (homólogo murino de MxA)
	MxA (proteína de mixovirus humana)
	ng (nanogramo)
	ORF (fase de lectura abierta)
20	Ori (origen de replicación)
	OriP (origen de replicación del Virus de Epstein Barr)
	pBRES (Sistema de Expresión Regulado por plásmido Berlex)
	p65 (dominio regulador de la transcripción de la proteína p65 de NFkappaB)
	PBS (solución salina tamponada con fosfato)
25	PEG (polietilenglicol)
	PINC (polímero No Condensador de Interacción Protector)
	pg (picogramo)
	pk (farmacocinética)
	poliA o poli(A) (sitio de poliadenilación)
30	RP (receptor de progesterona)
	pro (promotor)
	PTK (promotor del gen de la timidina quinasa del Virus del Herpes Simple)
	ori pUC (origen de replicación de los plásmidos pUC)
	i (inverso)
35	MR (molécula reguladora)
	ARN (ácido ribonucleico)
	rpm (revoluciones por minuto)
	TA (temperatura ambiente)
	s.c. o SC (subcutáneo)
40	SEAP (Fosfatasa Alcalina Secretada)
	RHE (receptor de hormonas esteroideas)
	ARNhc (ARN de horquilla corto)
	ARNip (ARN de interferencia pequeño)
	pro actina de m.e. (promotor de actina de músculo esquelético)
45	SkM o Sk (músculo esquelético)
	SV40 (virus del simio 40)
	TK (timidina quinasa)
	TKpA (poli A de timidina quinasa)
	MT (molécula terapéutica)
50	UbiB (Ubiquitina B)
	ug (microgramo)
	5'UTR (región 5' no traducida)
	UT12 (región 12 no traducida)
	VP-16 (domino de transactivación VP-16 del herpes virus)
	vol. (volumen)
55	WPRE (Elemento Regulador Postranscripcional del Virus de la Hepatitis de Marmota)

### Término técnicos y científicos

Los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los significados normalmente entendidos por un experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención salvo que se defina de otra manera. En el presente documento se hace referencia a diversas metodologías conocidas por los expertos habituales en la técnica. Los trabajos de referencia convencionales expuestos en los principios generales de la tecnología de ARN recombinante incluyen Sambrook, J., y col. (1989) Molecular Cloning.: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Planview, N. Y.; McPherson, M. J., Ed. (1991) Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford; Jones, J. (1992) Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Science Publications, Oxford; Austen, B. M. and Westwood, O. M. R. (1991) Protein Targeting and Secretion, IRL Press,

Oxford. Cualquiera de los materiales y procedimientos adecuados conocidos por los expertos habituales en la técnica pueden utilizarse en la realización de la presente invención; sin embargo, se describen materiales y/o procedimientos preferidos. A menos que se defina de otra manera, los materiales, reactivos y similares a los cuales se hace referencia en la siguiente descripción así como los ejemplos pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales.

### Sistema de Expresión Regulado

El sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención es una tecnología muy innovadora que proporciona ácidos nucleicos que codifican una molécula terapéutica (MT) que puede administrarse y expresarse en las células de un sujeto, de tal manera que la expresión y/o actividad de la MT esté regulada y proporcione un beneficio terapéutico al sujeto para el tratamiento de la enfermedad. En particular, la presente invención proporciona nuevas moléculas activadoras (MA), moléculas inactivadoras (MI) y moléculas reguladoras (MR) que tienen propiedades mejoradas.

Por ejemplo, una ventaja de las nuevas MA y MI de la presente invención es que se unen selectivamente a una MR que tiene modificaciones que potencian esta selectividad, por ejemplo, modificaciones en el LBD de la MR y más particularmente en el LBP de la MR. Por lo tanto, las nuevas MA y MI de la presente invención tienen propiedades mejoradas que se unen selectivamente o de otra manera interaccionan con una MR de la presente invención y disminuyen o eliminan la reactividad cruzada con proteínas endógenas, particularmente proteínas humanas endógenas, por ejemplo, un receptor, más particularmente, un receptor de esteroides, e incluso más particularmente un receptor RP o de glucocorticoides (RG). En algunas realizaciones, una nueva MA o MI de la presente invención es un modulador de MR, particularmente un modulador de receptor modificado, más particularmente un modulador de receptor de esteroides modificado, incluso más particularmente un modulador de RP o RG modificado, por ejemplo, un análogo de ligando de RP o RG, respectivamente. En una realización, el análogo del ligando de RP se une selectivamente a una MR que tiene un LBD modificado o más particularmente un LBP modificado, y tiene efectos secundarios disminuidos o no tiene con respecto por ejemplo a reactividad cruzada con RP endógena u otros receptores de esteroides endógenos, actividad abortiva o actividad anticonceptiva.

Más particularmente, una ventaja del sistema de expresión regulado de la presente invención es que las nuevas MA, MI y MR de la presente invención proporcionan una expresión estrechamente modulada de una MT, por ejemplo, una proteína o un ácido nucleico, en células de un sujeto, de tal manera que la expresión y/o actividad de la MT puede modularse, por ejemplo, para aumentar o disminuir, o activar y desactivar, la expresión y/o actividad de la MT. Cabe destacar, que las MA y MI de la presente invención tienen selectividad mejorada para una MR sobre una proteína endógena.

El dominio de unión a ligando (LBD), y más particularmente el bolsillo de unión a ligando (LBP), de la MR está modificado para unirse a una MA y/o ser sensible a la MA, con una especificidad y selectividad mejoradas. En algunas realizaciones, la MA se une a una sola MR modificada para unirse selectivamente a la MA. Por ejemplo, una MA de la presente invención puede ser, pero sin limitación, una MA que se une selectivamente a y/o activa una MR, y tiene escaso o ningún efecto sobre una proteína endógena, por ejemplo, un receptor, más particularmente un receptor de esteroides e incluso más particularmente un RP o RG. Además, por ejemplo, la MR de la presente invención puede ser, pero sin limitación, una MR que tenga un LBD de receptor modificado, o más particularmente un LBP de receptor modificado, que se une específicamente y/o de otra manera interaccione con una MA y de esta manera se active mediante la MA. En una realización, la MA se une o de otra manera interacciona con la MR y activa selectivamente la MR, de tal manera que la MR activada aumenta o activa la expresión de la MT. Por lo tanto, una MA y/o MR de la presente invención, proporciona la capacidad de regular estrecha y específicamente el nivel de expresión y/o actividad de MT.

El dominio de unión a ligando (LBD), y más particularmente el bolsillo de unión a ligando (LBP), de la MR está modificado para unirse a una MI y/o ser sensible a la MI, con una especificidad y selectividad mejoradas. En algunas realizaciones, la MI se une a una sola MR modificada para unirse selectivamente a la MI. Por ejemplo, una MI de la presente invención puede ser, pero sin limitación, una MI que se une selectivamente a y/o inactiva una MR, y tiene escaso o ningún efecto sobre una proteína endógena, por ejemplo, un receptor, más particularmente un receptor de esteroides e incluso más particularmente un RP o RG. Además, por ejemplo, la MR de la presente invención puede ser, pero sin limitación, una MR que tenga un LBD de receptor modificado, o más particularmente un LBP de receptor modificado, para unirse específicamente y/o de otra manera interaccionar con una MI y por lo tanto se activa por la MA. En una realización, la MA se une o de otra manera interacciona con la MR y activa selectivamente la MR, de tal manera que la MR activada aumenta o activa la expresión de la MT. Por lo tanto, una MA y/o MR de la presente invención proporciona la capacidad de regular estrecha y específicamente el nivel de expresión y/o actividad de MT.

Una ventaja adicional de la presente invención es que proporciona la expresión y/o actividad de una MT, en las células de un sujeto, de una manera dependiente de la dosis o de una manera dependiente de la orientación (como se describe en el presente documento), por ejemplo, dependiendo de la cantidad de molécula reguladora (MR) presente en o administrada a un sujeto, o la orientación de un ácido nucleico que codifica una MT, respectivamente. Por consecuencia, otra ventaja de las composiciones y procedimientos de la presente invención es que pueden

usarse para optimizar la terapia de una manera específica contra una enfermedad o una patología de un sujeto. Una ventaja adicional del sistema de expresión presente es que puede comprender un solo vector de ácido nucleico, que puede administrarse a un sujeto mediante una sola inyección. Por tanto, el presente sistema de expresión proporciona ventajas significativas sobre la terapia basada en ácido nucleico conocida o terapia basada en proteína en embolada.

En particular, el sistema de expresión de la presente invención proporciona la expresión regulada a largo plazo de una MT (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico) en las células de un sujeto, dando como resultado una eficacia terapéutica minimizando al mismo tiempo los efectos secundarios limitantes de la dosis. Más particularmente, la terapia génica, usando el sistema de expresión de la presente invención, puede proporcionar una expresión regulada prolongada de una proteína y por lo tanto minimizar los efectos secundarios limitantes de la dosis y maximizar la eficacia terapéutica de la proteína para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto. Por ejemplo, se ha demostrado que el interferón beta (IFN- $\beta$ ) es un fármaco proteico eficaz para sujetos con esclerosis múltiple (EM) reduciendo la gravedad de la enfermedad y ralentizando su avance. Sin embargo, se sabe que el IFN- $\beta$  tiene una semivida corta en circulación. Además, la administración frecuente local de la proteína puede producir efectos secundarios dependientes de la dosis. Sin embargo, usando el sistema de expresión regulado de la presente invención, puede administrarse un ácido nucleico que codifique un IFN- $\beta$  (por ejemplo, IFN- $\beta$ -1a) a las células de un sujeto y la expresión del IFN- $\beta$  codificado en las células puede regularse a largo plazo y optimizarse para conseguir una eficacia terapéutica máxima y mínimos efectos secundarios limitantes de la dosis del fármaco IFN- $\beta$  para el tratamiento de la EM.

Una MA que es un activador de pequeña molécula, en forma de píldora disponible por vía oral, controla la inducción del promotor y la posterior expresión de una MT codificada por una secuencia de ácido nucleico del sistema de expresión regulado de la presente invención. De esta manera, el nivel de la MT expresada (por ejemplo, una proteína de ácido nucleico) en circulación en un sujeto puede regularse estrechamente de una manera activa/inactiva y/o de una manera dependiente de la dosis. Una MA de la presente invención puede controlar directa o indirectamente la expresión de una MT. Por ejemplo, en una realización la MA activa una MR, y por lo tanto la presencia de la MR activada modula (por ejemplo, induce) la expresión de la MT en las células de un sujeto. Por tanto, otra ventaja del sistema de expresión regulado de la presente invención es que permite la opción de una terapia continua frente a una terapia pulsátil de una MT expresada en las células de un sujeto (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico) y la modulación de niveles de expresión de la MT, para optimizar la eficacia terapéutica de la MT minimizando al mismo tiempo cualquiera de los efectos secundarios de la misma. En particular, el sistema de expresión regulado de la presente invención permite por primera vez la opción de una terapia continua y duradera, frente a una terapia pulsátil de IFN- $\beta$  en sujetos con EM. Adicionalmente, otra ventaja de la presente invención es que puede proporcionar una expresión renovable de una MT en las células de un sujeto mediante administración repetida de un vector de ácido nucleico que codifica la MT.

Más particularmente, el sistema de expresión regulado de la presente invención permite la terapia específica del sujeto o específica de enfermedad, modulando y optimizando el nivel de expresión de una MT en las células de un sujeto, para conseguir una eficacia terapéutica máxima y efectos secundarios mínimos. Como se usa en el presente documento, terapia “específica de sujeto” o “específica de enfermedades” se refiere al tratamiento que es específico a un sujeto que tiene una enfermedad, etapa de enfermedad o patología o síntoma específico. Por ejemplo, usando el sistema de expresión regulado de la presente invención, el nivel de IFN- $\beta$  expresado en las células de un sujeto que tiene EM pueden modularse y optimizarse para conseguir una eficacia terapéutica máxima y efectos secundarios mínimos, para el tratamiento de una afección, síntoma o fase de EM específico (por ejemplo remisión recidivante, progresiva primaria o progresiva secundaria); de acuerdo con la respuesta o tolerancia del sujeto frente a IFN- $\beta$ .

Más específicamente, la presente invención proporciona un sistema de expresión génico regulado mejorado y composiciones farmacéuticas y procedimientos de los mismos para el tratamiento de enfermedades. La MT codificada puede ser un ácido nucleico o una proteína que proporcione un beneficio terapéutico a un sujeto que tenga, o sea susceptible de, una enfermedad. Como se usa en el presente documento, “beneficio terapéutico” o “actividad terapéutica” incluye, pero sin limitación, la mejora, modulación, disminución, represión, estabilización, o prevención, retraso o reducción de la aparición o progresión de una enfermedad o síntoma o afección de una enfermedad. Como se usa en el presente documento, “sujeto” se refiere a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) y más particularmente, se refiere a un mamífero que necesita el tratamiento para una enfermedad. “Tratamiento”, “tratando”, “tratar” o equivalentes gramaticales de los mismos, se refiere a proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto para una enfermedad, incluyendo una etapa, síntoma o afección de una enfermedad. “Enfermedad” como se usa en el presente documento incluye una etapa, síntoma, afección o patología de una enfermedad, o la predisposición genética para adquirir una enfermedad. Dichas enfermedades pueden ser enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias. En algunas realizaciones, la enfermedad es un cáncer. En algunas realizaciones, la enfermedad es, por ejemplo, esclerosis múltiple, leucemia, melanoma, hepatitis o cardiomiopatía. Adicionalmente, el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención proporciona una nueva estrategia para inducir por ingeniería genética cambios en un genoma animal (por ejemplo, un genoma murino) de tal manera que la función del gen en un modelo animal puede analizarse de manera precisa y pueden generarse modelos animales creíbles (por ejemplo, modelos murinos) de enfermedades humanas. En particular, el sistema de



expresión regulado mejorado de la presente invención proporciona una herramienta valiosa para la investigación biomédica debido a que el uso del presente sistema, expresión de una molécula diana, por ejemplo, un gen diana en un genoma animal (u otra molécula de la presente invención), puede regularse temporalmente de una manera específica espacial.

5 Adicionalmente, el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención proporciona una nueva estrategia para la expresión selectiva o única del ARNhc diana tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, usando el sistema de expresión regulado de la presente invención, puede modificarse un sistema de expresión basado en polimerasa II (POL II) para generar un ARNhc diana de manera selectiva o única. Por ejemplo, para generar de manera única un ARNhc diana, el sistema de expresión regulado de la presente invención puede modificarse y usarse para generar el ARNhc uniendo operativamente un promotor POL II a un gen que contenga un intrón, y el intrón de corte y empalme resultante procesado mediante la inclusión de secuencias MIR expresen el ARNhc diana. Además, por ejemplo, los sitios de unión a GAL-4 dirigidos por la proteína MR de los presentes vectores y casetes de expresión descritos en el presente documento podían insertarse cadena arriba de un promotor U6 para crear un sistema sensible a MR con la modificación posible adicional de intercambiar el transactivador p65 por un activador e polimerasa III (POL III) (por ejemplo, Oct-2<sup>Q</sup>).

La presente invención proporciona un sistema de expresión regulado mejorado que comprende al menos un primer casete de expresión que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, de tal manera que, cuando se administran las células de un sujeto, la MT codificada se expresa, y la expresión y/o actividad de la MT se regula en presencia de una molécula reguladora (MR). “Regulación” de la actividad y/o expresión de una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT) como se usa en el presente documento se refiere a la modulación de la expresión y/o actividad de la molécula que da como resultado, por ejemplo, la inducción, represión, aumento o disminución de una actividad y/o la expresión de dicha molécula. Otros ejemplos de dicha regulación incluyen, pero sin limitación, la modulación de una cantidad, conformación, transducción de señal, especificidad de unión, semivida, estabilidad u otra modificación celular o procesamiento de una molécula de la presente invención, (por ejemplo, una MT). En realizaciones preferidas la MT del sistema de expresión de la presente invención está regulada. Sin embargo, ejemplos de otras moléculas que son adecuados para la regulación en el sistema de expresión presente incluyen, pero sin limitación una MR, una molécula activadora (MA) y una molécula inactivadora (MI) como se describe en el presente documento.

La expresión y/o actividad de la MT está regulada de una manera de respuesta a la dosis o de una manera dependiente de la dosis, por ejemplo de acuerdo con la cantidad de una MR presente en las células del sujeto o administrada al sujeto. En otras realizaciones la expresión y/o actividad de la MT está regulada de una manera sensible a la dosis o dependiente de la dosis, por ejemplo, de acuerdo con la cantidad de una molécula activadora (MA), o molécula inactivadora (MI) presente en las células del sujeto o administrar al sujeto. En una realización, la expresión y/o actividad de la MT se regula de una manera sensible a la dosis o dependiente de la dosis de acuerdo con la cantidad de la misma MT o diferente MT presente en las células del sujeto o administrada al sujeto. Como se usa en el presente documento, “sensible a dosis” o “dependiente de la dosis” se refiere a la correlación de la expresión y/o actividad de una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT), con la presencia en, o administración a, las células de un sujeto, de una dosis o cantidad particular de una segunda molécula. Ejemplos de dicha segunda molécula incluyen, pero sin limitación, una MR, una MA, una MI o una MT. Otros ejemplos de una segunda molécula incluyen una molécula celular, por ejemplo, un biomarcador (por ejemplo, un biomarcador asociado con una enfermedad).

Como se usa en el presente documento “células de un sujeto” se refiere a células autólogas de un sujeto, o a células heterólogas (o células donantes) que no proceden de un sujeto pero que se suministran o administran a un sujeto como se describe en el presente documento. Preferentemente, las células autólogas están presentes en un sujeto, y las células heterólogas se administran y están presentes en un sujeto. En realizaciones preferidas, se suministra una composición de la presente invención, por ejemplo, un vector que codifica una MT y/o una MR *in vivo* a células autólogas de un sujeto, de tal manera que la molécula codificada se expresa en las células presentes en el sujeto. En una realización, una composición de la presente invención, por ejemplo, un vector que codifica una MT y/o una MR se administra *ex vivo* a células autólogas o heterólogas de un sujeto y después las células tratadas se suministran a un sujeto, de tal manera que la molécula codificada se expresa en las células presentes en el sujeto.

La expresión y/o actividad de la MT depende de la orientación. Como se usa en el presente documento, “dependiente de la orientación” se refiere a la orientación de 5' a 3' de un casete de expresión que codifica una MT de la presente invención, o a la dirección 5' a 3' de la transcripción o traducción de una MT codificada de la presente invención, y en algunas realizaciones la orientación es: con respecto a un vector que comprende el casete de expresión o que codifica la MT; con respecto a la orientación de otro casete de expresión del mismo vector; o con respecto a la orientación de la expresión de otra molécula codificada por el mismo vector. Por ejemplo, en una realización, la expresión y/o actividad de la MT en las células está modulada con respecto a la orientación 5' a 3' del casete de expresión que codifica la MT, o con respecto a la orientación 5' a 3' de la transcripción o traducción de la MT codificada. Por consiguiente, la expresión y/o actividad de la MT puede modularse mediante la selección de una orientación particular del casete de expresión que codifica la MT o la orientación de la transcripción o traducción de la MT.

El sistema de expresión regulado de la presente invención comprende al menos un casete de expresión que codifica una MT y puede comprender casetes de expresión adicionales que codifiquen una o más de las moléculas de la presente invención, por ejemplo, una MT, MR, MA o MI. Adicionalmente, uno o más casetes de expresión pueden estar presentes en un solo vector, o en más de un vector. Adicionalmente, la presente invención no se limita a una sola MT, MR, MA o MI e incluye realizaciones que tienen una o más, o múltiples de una MT, MR, MA o MI de la presente invención, que pueden estar presentes en solitario o junto con un solo vector o en más de un vector. Como se usa en el presente documento, "vector" se refiere a un ácido nucleico adecuado para insertar y expresar en células una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más moléculas de la presente invención, por ejemplo, una MT, MR, MA o MI. "Casete de expresión", como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que codifica los componentes necesarios o secuencias funcionales para la expresión en células de una molécula de la presente invención (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico de MT, MR, MA o MI), en el que la molécula está codificada por una secuencia de ácido nucleico insertada operativamente en el casete de expresión (por ejemplo, en un sitio de clonación en el casete de expresión) y unida operativamente a las secuencias funcionales del casete de expresión. Una secuencia o secuencias "unidas operativamente" o "insertadas operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia o secuencias fusionadas, unidas, adheridas o de otra manera agrupadas con otra secuencia de tal manera que las secuencias respectivas funcionen como se desea, de manera conocida y/o para conseguir un resultado particular (por ejemplo, una secuencia promotora unida operativamente a una secuencia génica para promover la transcripción del gen codificado).

Las Figuras 1A y 1B ilustran ejemplos no limitantes de un sistema de expresión regulado de la presente intención que comprende: 1) un primer casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica (MT) y una primera secuencia promotora que codifica un sitio de unión a ADN (DBS) y una secuencia TATA unida operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico; 2) un segundo casete de expresión que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula reguladora (MR) y una segunda secuencia promotora unida operativamente a la segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la MR comprende un dominio de unión a ADN (DBD), dominio de unión a ligando (LBD) y un dominio regulador (DR) y más específicamente, en la Figura 1B, un dominio de activación (DA); y 4) una molécula activadora o inactivadora (MA/MI) que activa la MR o inactiva la MR, respectivamente, de tal manera que la presencia de la MR activada o inactivada regula la expresión y/o actividad de la MT.

La FIGURA 39 ilustra un sistema de expresión regulado que combina la molécula reguladora (MR) y la molécula terapéutica (MT) o gen indicador en un solo plásmido. El sistema de expresión regulado de la invención, representado en la orientación pGT79, comprende: 1) un primer casete de expresión que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica (MT) o un gen indicador y una primera secuencia promotora que codifica un sitio de unión al ADN (DBS) y una secuencia TATA unida operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico; 2) un segundo casete de expresión que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula reguladora (MR) y una segunda secuencia promotora unida operativamente a la segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la MR comprende un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio de unión a ligando (LBD) y un dominio de transactivación (DA) de VP16 o p65. Una molécula activadora (MA) activa la MR, de tal manera que la presencia de la MR activada o inactivada regula la expresión y/o actividad de la MT (FIG. 40).

Un primer casete de expresión comprende las siguientes secuencias funcionales unidas operativamente: 6x del DBS de GAL-4, TATA de E1b y un sitio de inicio de la transcripción (por ejemplo, SEC ID N°: 1), región 5' no traducida UT12 (por ejemplo, SEC ID N°: 2), intrón sintético IVS8 (por ejemplo, SEC ID N°: 3), sitio de clonación múltiple (por ejemplo, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 5), sitio de poliadenilación (poli(A)) de la hormona del crecimiento humano (hGH) (por ejemplo, SEC ID N°: 6); y un segundo casete de expresión que comprende las siguientes secuencias funcionales unidas operativamente: el promotor de alfa actina del músculo esquelético de pollo (por ejemplo, SEC ID N°: 7) y el sitio poli(A) del SV40 (por ejemplo, SEC ID N°: 8). En una realización preferida, el primer y segundo casete de expresión están presentes en un solo vector (por ejemplo como se ilustra esquemáticamente en las Figuras 1A-B). En otra realización preferida, el vector es un vector plasmídico simple, por ejemplo, pGT1 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 4), pGT2 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 4), pGT3 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11 y la SEC ID N°: 4), o pGT4 (SEC ID N°: 12), en el que cada vector comprende un sitio de clonación múltiple (SEC ID N°: 4) localizado en dirección 3' del IVS8 y 5' del sitio poli(A) de hGH (por ejemplo, como se representa de forma esquemática en las Figuras 14A-D), o pGT11 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 5), pGT12 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 5), pGT13 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 5) o pGT14 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 5), en el que cada vector comprende un sitio de clonación múltiple (SEC ID N°:5) localizado en dirección 3' del sitio IVS8 y 5' de poli(A) de hGH. En una realización preferida, el vector es un solo vector plasmídico, por ejemplo, pGT79 (SEC ID N°: 59), o un solo vector plasmídico derivado de pGT79, por ejemplo, pGT1003 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 60 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 61), pGT1004 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 62 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 63), pGT1005 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 64 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 65), pGT1006 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 66 que codifica una

5 secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 67), pGT1007 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 68 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 69), pGT1008 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 70 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 71), pGT1009 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 72 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 73), pGT1015 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 74 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 75), pGT1016 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 76 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 77), pGT1017 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 78 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 79), pGT1025 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 80 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 81), pGT1020 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 82 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 83), pGT1021 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 84 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 85), pGT1022 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 86 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 87), pGT1023 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 88 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 89), o pGT1024 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 90 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 91).

Adicionalmente, la MT es un IFN- $\beta$  o GM-CSF. Por ejemplo, en una realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica una MT que es un IFN- $\beta$  1 humano que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13, y está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 14. En otra realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica una MT que es un IFN- $\beta$  de ratón que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15, y está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 16. En otra realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica una MT que es un GM-CSF humano que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 18. En otra realización, la primera secuencia de ácido nucleico codifica una MT que es un GM-CSF de ratón que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19 y está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 20. Adicionalmente, en las realizaciones preferidas, la MR es una variante de un receptor de progesterona (RP) de tipo natural o de origen natural. Por ejemplo, en una realización, la segunda secuencia de ácido nucleico codifica una MR que es un RP mutado que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22, y está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 21.

La secuencia de ácido nucleico que codifica una MT se inserta o se clona en los sitios de las enzimas de restricción Spe I y Not I de un MCS de un primer casete de expresión de un solo vector plasmídico. En una realización, el único vector plasmídico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT es, por ejemplo, pGT23 (SEC ID N°: 23), pGT24 (SEC ID N°: 24), pGT25 (SEC ID N°: 25) o pGT26 (SEC ID N°: 26), en el que la MT codificada es un IFN- $\beta$  de ratón (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15 y/o está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 16) y la orientación 5'-3' de la transcripción de la MT codificada y de la secuencia de ácido nucleico insertada se ilustra esquemáticamente en la Figura 15A (véase la flecha). En otra realización, el único vector plasmídico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT es por ejemplo, pGT27 (SEC ID N°: 27), pGT28 (SEC ID N°: 28), pGT29 (SEC ID N°: 29) o pGT30 (SEC ID N°: 30), en el que la MT codificada es un IFN- $\beta$  humano (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13 y/o está codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 14). En una realización preferida, el único vector plasmídico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT es, por ejemplo, pGT79 (SEC ID N°: 59) o un único vector plasmídico derivado de pGT79, por ejemplo, pGT1003 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 60 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 61), pGT1004 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 62 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 63), pGT1005 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 64 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 65), pGT1006 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 66 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 67), pGT1007 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 68 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 69), pGT1008 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 70 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 71), pGT1009 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 72 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 73), pGT1015 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 74 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 75), pGT1016 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 76 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 77), pGT1017 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 78 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 79), pGT1025 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 80 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 81), pGT1020 (que comprende una secuencia de ácido

nucleico que comprende la SEC ID N°: 82 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 83), pGT1021 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 84 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 85), pGT1022 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 86 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 87), pGT1023 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 88 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 89) o pGT1024 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 90 que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID N°: 91), en el que la MT codificada es un IFN- $\beta$  de ratón (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15 y/o codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 16), o IFN- $\beta$  humana (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13 y/o codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 14).

Adicionalmente el vector plasmídico sencillo que comprende la secuencia de ácido nucleico de una estructura vectorial (por ejemplo, SEC ID N°: 12), MCS (por ejemplo, SEC ID N°: 31) y fragmento Spel-NotI (SEC ID N°: 31), en el que el fragmento codifica una MT que es un IFN- $\beta$  de ratón, tiene una secuencia Spel en el extremo 5' y una secuencia NotI en el extremo 3' compatible para la inserción del fragmento en el sitio Spel-NotI en el MCS (sitio de clonación múltiple), y se inserta en el sitio Spel-NotI del MCS. Adicionalmente, en una realización, el vector plasmídico sencillo comprende la secuencia de ácido nucleico de una estructura vectorial (por ejemplo, SEC ID N°: 12), MCS (por ejemplo, SEC ID N°: 32) y fragmento Spel-NotI (SEC ID N°: 31), en el que el fragmento codifica una MT es un IFN- $\beta$  humano, tiene una secuencia Spel en el extremo 5' y una secuencia NotI en el extremo 3' compatible para la inserción del fragmento en el sitio Spel-NotI en el MCS y se inserta en el sitio Spel-NotI del MCS.

Adicionalmente una MA se une a la MR y activa la MR, por lo tanto, la MR activada se une al DBS de la secuencia promotora unida operativamente a la secuencia de la MT, dando como resultado la inyección de la expresión y/o actividad de la MT, en las células (por ejemplo células de mamífero). Sin embargo, en otra realización, una molécula inactivadora (MI) se une a la MR e inactiva la MR, por lo tanto, la MR inactivada no se une al DBS del promotor de MT, dando como resultado la represión o la ausencia de inducción de expresión y/o actividad de la MT. En una realización del ejemplo ilustrado en la Figura 1B, una molécula activadora (MA) se une al LBD de la MR y activa la MR, por lo tanto, la MR activada forma un homodímero que se une al DBS del promotor unido operativamente a la secuencia MT, dando como resultado la inducción de la expresión y/o actividad de la MT en células (por ejemplo, células de mamífero). En otra realización de los ejemplos ilustrados en las Figuras 1A y 1B, el primer y segundo casete de expresión están presentes en un solo vector. En otra realización, un primer casete de expresión codifica una MT y un segundo casete de expresión codifica una MR de la presente invención están presentes en un solo vector (por ejemplo, pGT23 (SEC ID N°: 23), pGT24 (SEC ID N°: 24), pGT25 (SEC ID N°: 25), pGT26 (SEC ID N°: 26), pGT27 (SEC ID N°: 27), pGT28 (SEC ID N°: 28), pGT29 (SEC ID N°: 29) o pGT30 (SEC ID N°: 30)). En una realización del ejemplo ilustrado en la Figura 40, una molécula activadora (MA) se une al LBD de la MR y activa la MR, por lo tanto, la MR activada forma un homodímero que se une al DBS del promotor unido operativamente a la secuencia MT dando como resultado la inducción de la expresión y/o actividad de la MT en células (por ejemplo, células de mamífero). En otra realización de los ejemplos ilustrados en la Figura 39, el primer y segundo casetes de expresión están presentes en un solo vector. En otra realización preferida, en un solo vector están presentes un primer casete de expresión que codifica una MT y un segundo casete de expresión que codifica una MR de la presente invención (por ejemplo, pGT79, pGT1003, pGT1004, pGT1005, pGT1006, pGT1007, pGT1008, pGT1009, pGT1015, pGT1016, pGT1017, pGT1025, pGT1020, pGT1021, pGT1022, pGT1023 o pGT1024).

Como se usa en el presente documento una "molécula terapéutica" o "MT" se refiere a una molécula que tiene una actividad terapéutica o proporciona un beneficio terapéutico. Una MT de la presente invención puede ser un ADN, ARN o proteína aislado, o variante de los mismos codificados por una secuencia de ácido nucleico y que tienen actividad terapéutica. Como se usa en el presente documento, "variantes" incluyen muteínas, por ejemplo, muteínas de un ADN, ARN, proteína o compuesto químico aislado. Más particularmente, una MT de la presente invención puede ser un ADN, un ARN o una proteína modificado, sintético o recombinante. Como se usa en el presente documento "modificado", incluye moléculas modificadas química, sintéticamente, o por tecnología recombinante, incluyendo por ejemplo moléculas mutadas, fusionadas o quiméricas. En una realización, la MT codificada es una proteína que se expresa y se escinde o procesa en las células de un sujeto y por lo tanto da como resultado múltiples MT, o una MT activada, o una MT que difiere de la MT expresada y no escindida o no procesada. En otra realización de la presente invención, la MT codificada es un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN) que tiene una actividad terapéutica. En una realización, el ARN codificado codifica sitios de corte y empalme múltiples que están cortados y empalmados de manera múltiple o diferencialmente en las células de un sujeto. En algunas realizaciones, los ARN cortados y empalmados de forma múltiple o diferencialmente codifican diferentes proteínas o variantes, o comprenden diferentes o variantes ARN, que tienen una actividad terapéutica similar o diferente. En algunas realizaciones, los ARN cortados y empalmados de manera múltiple o diferencialmente están cortados y empalmados en respuesta a la presencia de un factor específico, enfermedad, afección o tejido.

La MT codificada es una proteína que tiene una actividad terapéutica y, preferentemente, es una proteína humana o una variante de la misma. En una realización adicional, la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína es un gen o un fragmento génico. En una realización, la MT es un factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF). En otra realización, la MT es un interferón, por ejemplo, interferón beta (IFN- $\beta$ ),

y más particularmente, es IFN- $\beta$  1a o IFN- $\beta$  1 b. En algunas realizaciones la MT codificada es un anticuerpo, y preferentemente un anticuerpo policlonal (por ejemplo, CAMPATH). Pueden identificarse secuencias adecuadas que codifiquen un anticuerpo monoclonal y pueden prepararse usando procedimientos conocidos en la técnica e insertarse en un vector del sistema de expresión regulado de la presente invención como se describe en el presente documento. La actividad terapéutica de anticuerpos monoclonales se ha descrito (véase por ejemplo, Gatto, B. (2004) 4: 411-414; Groner y col. (2004) 4: 539-547).

Como se usa en el presente documento "molécula reguladora" o "MR" se refiere a una molécula que regula la expresión y/o actividad de una MT de la presente invención. Los ejemplos de dicha regulación mediante una MR de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la modulación de la expresión y/o actividad de la MT y, más particularmente, un aumento, disminución, activación (o inducción), o inactivación (o represión) de la expresión y/o actividad de la MT, mediante una MR de la presente invención. Adicionalmente dicha modulación de la expresión y/o actividad de la MT por una MR de la presente invención puede ser directa (por ejemplo, por contacto directo de una MR con una MT) o indirecto (por ejemplo, en el que la MR efectúa una molécula en una ruta de transducción de señal que da como resultado la modulación de la expresión y/o actividad de la MT). Los ejemplos adicionales de las MR adecuados para su uso en el sistema de expresión regulado de la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas que efectúan expresión celular, actividad o procesamiento de una MT de la presente invención. Los ejemplos de dichas MR adecuadas incluyen, pero sin limitación, moléculas reguladoras transcripcionales (por ejemplo, que activan, inactivan, disminuyen o aumentan la transcripción de un ARN de una MT expresada); moléculas procesadoras de ARN (por ejemplo moléculas que activan o inactivan disminuyen o aumentan el procesamiento del ARN tal como corte y empalme de ARN, poliadenilación o escisión de un ARN de una MT expresada); o moléculas que efectúan la traducción de proteínas o el procesamiento postraduccional de una proteína (por ejemplo, enzimas que activan, inactivan, disminuyen o aumentan la fosforilación, escisión o formación de una conformación o forma multimérica particular de una proteína de una MT expresada).

Una MR de la presente divulgación puede ser una molécula de origen natural, modificada o aislada o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, la MR de la presente invención es una molécula sintética o recombinante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una MR de la presente divulgación es un compuesto químico, ADN, ARN o proteína. Adicionalmente, en algunas realizaciones, una MR de la presente invención es una molécula modificada. En una realización, la MR es una proteína inmunizada. En otra realización, la MR es una proteína humana o variante de la misma. Por ejemplo, en una realización, la MR es un activador transcripcional, por ejemplo, un receptor de esteroides y, más particularmente, un receptor de progesterona. En una realización, la MR comprende un dominio de transactivación (por ejemplo, un dominio de transactivación VP16 o p65, véase por ejemplo, Schmitz y col. (1991) EMBO J 10: 3805-3817; Moore y col. (1993) Molec and Cell Biol 13: 1666; Blair y col. (1994) Molec and Cell Biol 14: 7226-7234), y/u otro dominio funcional (por ejemplo, un dominio de interacción del factor basal) de un coactivador (por ejemplo, p300/CBP), un factor de la transcripción basal (por ejemplo TFIIB) o una histona acetiltransferasa (por ejemplo p300/CBP o P/CAF, Latchman, D. (2004) Eukaryotic Transcription Factors, Elsevier Academic Press, Londres; Goodman y col. (2000) Genes & Devl 14: 1553-1577; Shikama y col. (1997) Trends in Cell Bio 7: 230-236). En otra realización, la MR comprende un dominio de unión al ligando (LBD). Adicionalmente, en una realización, una MA se une al LBD de la MR, activando por lo tanto la MR de tal manera que la presencia de la MR activada regula la expresión y/o actividad de la MT. En otra realización, la MR comprende un DBD, por ejemplo un DBD GAL-4. En una realización, la MR comprende un DBD que se une a una secuencia funcional (por ejemplo, una secuencia promotora) unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una MT, regulando por lo tanto la expresión de la MT (por ejemplo, induciendo la expresión de la MT).

Una MR de la presente divulgación está activada por una molécula activadora (MA) y, por lo tanto, la expresión y/o actividad de la MT está regulada en presencia de la MR activada. Como se usa en el presente documento "molécula activadora" o "MA" se refiere a una molécula que induce o aumenta la expresión y/o actividad de una MR de la presente invención. Los ejemplos de dicha activación mediante una MA incluyen, pero sin limitación la inducción o aumento en la expresión y/o actividad de una MR de la presente invención. Adicionalmente dicha activación en la expresión y/o actividad de la MR mediante una MA de la presente invención puede ser directa (por ejemplo, por contacto directo de una MA con una MR) o indirecto (por ejemplo, en el que la MA afecta a una molécula en una ruta de transducción de señal que da como resultado la modulación de la expresión y/o actividad de la MR). Ejemplos adicionales de las MA adecuadas para su uso en el sistema de expresión regulado de la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas que efectúan un procesamiento celular de una MR de la presente invención (ejemplos de dicho procesamiento celular se describen en el presente documento, por ejemplo, anteriormente).

La MA es un biomarcador. En una realización adicional, la MA es un biomarcador para una enfermedad o afección, y más particularmente, es un biomarcador para una patología o afección o un síntoma de las mismas. En una realización, la MA activa la MR promoviendo o inhibiendo cambios conformacionales, procesamientos enzimáticos o modificación, unión específica o dimerización de la MR. En una realización preferida, la MA activa la MR promoviendo la homodimerización de la MR. En una realización, la MA activa la MR uniéndose a la MR y, más particularmente, a un dominio funcional de la MR, por ejemplo, un LBD de la MR.

Una MA de la presente divulgación puede ser una molécula de origen natural o aislada, o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la MA de la presente invención es una molécula sintética o recombinante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la MA de la presente invención es un compuesto químico, ADN, ARN o proteína.

Adicionalmente, en algunas realizaciones, la MA de la presente invención es una molécula modificada. En una realización, la MA es una proteína humanizada. En otra realización, la MA es una proteína humana o variante de la misma. En una realización, la MA es un compuesto químico, por ejemplo, una antiproggestina. En una realización, la MA es mifepristona. En una realización preferida, la MA es un análogo de ligando de RP, por ejemplo, BLX-913, BLX-833, BLX-899, BLX-593, BLX-599, BLX-952, BLX-610, BLX-117 o BLX-784.

El sistema de expresión regulado de la presente invención comprende: 1) un primer casete de expresión que tiene una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, y al menos un sitio de unión al ADN (DBS) de GAL-4 y, más particularmente, seis DBS de GAL-4 (6X DBS GAL-4), localizado cadena arriba y unido operativamente a la primera secuencia del ácido nucleico; 2) un segundo casete de expresión que tiene una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una MR que es un receptor de progesterona modificado que comprende un DA de VP-16 o un DA de p65 (por ejemplo, un DA p65 que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 39 o la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 40), LBD de progesterona (RP) y DBD de GAL-4, y una secuencia promotora de actina localizada cadena arriba y unida operativamente a la segunda secuencia de ácido nucleico; y 3) una MA que es un inductor de molécula pequeña, por ejemplo, un análogo del ligando de RP que, cuando se administra por vía oral a un sujeto, activa la MR expresada en las células del sujeto y, por lo tanto, la MR activada forma un dímero que se une a 6X de DBS de GAL-4 e induce la expresión de la MT codificada. En una realización preferida, el primer y segundo casetes de expresión están presentes en un solo vector.

La MR de la presente invención es un regulador transcripcional y, más particularmente, un receptor de esteroides mutado. En una realización, la MR es un RP humano mutado (hPR) y comprende un LBD del receptor hPR mutado, (por ejemplo, que tiene una delección en el extremo C de aproximadamente 19-66 aminoácidos), en el que la MR está activada en presencia de una MA que es un antagonista del RP de tipo natural a partir del cual deriva el RP mutante. En una realización preferida, el LBD de MR comprende un LBD de RP humano mutado o más particularmente un LBP de RP humano mutado que comprende una o más mutaciones dirigidas dentro del LBD o, más particularmente, el LBP. En otra realización, la MR de la presente invención comprende un dominio regulador (DR), por ejemplo, un dominio de activación (DA), y más particularmente, un dominio de transactivación (DT). Los ejemplos de dominios reguladores adecuados para su uso en la MR de la presente invención, incluyen, pero sin limitación, los conocidos en la técnica o descritos en el presente documento (por ejemplo, TAF-1, TAF-2, TAU-1 y TAU-2).

Una MR de la presente invención está inactivada y por lo tanto la expresión y/o actividad de la MT está regulada en presencia de una MR inactivada. Como se usa en el presente documento, "molécula inactivadora" o "MI" se refiere a una molécula que inactiva la expresión y/o actividad de una MR de la presente invención. Los ejemplos de dicha inactivación mediante una MI incluyen, pero sin limitación, la represión o disminución en la expresión y/o actividad de una MR de la presente invención. Además dicha inactivación en la expresión y/o actividad de la MR mediante una MI de la presente invención puede ser directa (por ejemplo, por contacto directo de una MI con una MR) o indirecta (por ejemplo, en el que la MI afecta a una molécula en una ruta de transducción de señal que da como resultado la inactivación de la expresión y/o actividad de la MR). Otros ejemplos de MI adecuados para su uso en el sistema de expresión regulado de la presente invención incluyen, pero sin limitación, moléculas que efectúan un procesamiento celular de una MR de la presente invención (ejemplos de dicho procesamiento celular se describen en el presente documento, por ejemplo, anteriormente).

Una MR de la presente invención se expresa o está presente en células de un sujeto en una forma activada y está inactivada en presencia de una molécula inactivadora (MI), por lo tanto, la expresión y/o actividad de la MT está regulada por la MR inactivada. En otra realización, la MI es un biomarcador. En otra realización, la MI es un biomarcador para una enfermedad o una afección y, más particularmente es un biomarcador para una patología o afección, o un síntoma de los mismos. En una realización, la MI inactiva la MR promoviendo o inhibiendo cambios conformacionales, procesamiento enzimático, unión específica o dimerización de la MR. En una realización preferida, la MI inactiva la MR inhibiendo la homodimerización de la MR. En una realización, la MI inactiva la MR uniéndose a la MR y, más particularmente, a un dominio funcional de la MR, por ejemplo, un DA de la MR.

Una MI de la presente divulgación puede ser una molécula de origen natural o aislada, o variante de los mismos. En algunas realizaciones, la MI de la presente invención es una molécula sintética o recombinante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la MI de la presente invención es un compuesto químico, ADN, ARN o proteína. Adicionalmente, en algunas realizaciones, la MI de la presente invención es una molécula modificada. En una realización, la MI es una proteína humanizada. En otra realización, la MI es una proteína humana o variante de la misma. En una realización preferida, la MI es un compuesto químico.

La expresión de una MT, MR, MA o MI de la presente divulgación puede ser constitutiva o transitoria. En algunas realizaciones, la expresión de una MT, MR, MA o MI está regulada o es específica del sitio (por ejemplo específica de músculo). Los ejemplos de una MR regulada incluyen, pero sin limitación, una MR que está activada por una MA o inactivada por una MI. En una realización, la expresión de una MT, MR, MA o MI de la presente invención está dirigida por un promotor regulado o un promotor específico de tejido. En una realización adicional, el promotor regulado o específico de tejido está regulado en presencia de una MR y, más particularmente, por la unión de la MR al promotor. En una realización, el promotor específico del tejido es un promotor específico de músculo y, más particularmente, un promotor de actina. En una realización, una MR de la presente invención se une a un promotor

unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT y por lo tanto regula la expresión de la MT codificada como se describe en el presente documento, en las células de un sujeto.

La MT, MR, MA o MI de la presente divulgación puede aislarse, producirse y modificarse usando procedimientos y ensayos conocidos para ácidos nucleicos, proteínas y compuestos químicos, como se describe en el presente documento, por ejemplo, a continuación.

### Composiciones farmacéuticas y procedimientos de tratamiento

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos para el tratamiento de diversas enfermedades que comprenden el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos para tratar una enfermedad o afección; regular la expresión de una MT; administrar una MT; suministrar una MT o expresar una MT en células de un sujeto, en el que los procedimientos comprenden poner en contacto las células de un sujeto con un sistema de expresión regulado de la presente invención, de tal manera que la MT codificada está expresada en las células del sujeto y tal sistema de expresión está regulado en presencia de una MR.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden al menos una MT, MR, MA o MI de la presente invención y, en algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica dichas moléculas están presentes en solitario o juntos en un solo vector o en más de un vector. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender más de una de cada MT, MR, MA o MI y más de un tipo de las mismas (por ejemplo, una primera y segunda MT, MR, MA y/o MI). Más particularmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender secuencias de ácido nucleico que codifican más de uno de cada MT, MR, MA o MI y más de un tipo de las mismas. En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención comprende al menos uno de los vectores de la presente invención (por ejemplo, pGT23 (SEC ID N°: 23), pGT24 (SEC ID N°: 24), pGT25 (SEC ID N°: 25), pGT26 (SEC ID N°: 26), pGT27 (SEC ID N°: 27), pGT28 (SEC ID N°: 28), pGT29 (SEC ID N°: 29), o pGT30 (SEC ID N°: 30), pGT79 (SEC ID N°: 59), pGT1003 (que comprende SEC ID N°: 60), pGT1004 (que comprende SEC ID N°: 62), pGT1005 (que comprende SEC ID N°: 64), pGT1006 (que comprende SEC ID N°: 66), pGT1007 (que comprende SEC ID N°: 68), pGT1008 (que comprende SEC ID N°: 70), pGT1009 (que comprende SEC ID N°: 72), pGT1015 (que comprende SEC ID N°: 74), pGT1016 (que comprende SEC ID N°: 76), pGT1017 (que comprende SEC ID N°: 78), pGT1025 (que comprende SEC ID N°: 80), pGT1020 (que comprende SEC ID N°: 82), pGT1021 (que comprende SEC ID N°: 84), pGT1022 (que comprende SEC ID N°: 86), pGT1023 (que comprende SEC ID N°: 88), o pGT1024 (que comprende SEC ID N°: 90)).

Una composición farmacéutica de la presente invención comprende al menos una MA o MI de la presente invención. En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención comprende uno o más vectores que codifican al menos una MT y/o MR. La MT, MR, MA y MI de la presente invención puede administrarse al sujeto por separado o juntas, y *ex vivo* o *in vivo*, usando cualquier medio de administración adecuado descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Los ejemplos de dichos medios de administración adecuados incluyen, pero sin limitación, inyección (por ejemplo, inyección intramuscular o subcutánea), administración oral y electroporación. En una realización, una MT y MR de la presente invención están presentes en un solo vector y se administran individualmente a partir de una MA que activa la MR (y, por lo tanto, la presencia de la MR activada regula la expresión y/o actividad de la MT). En una realización adicional, la MA es un compuesto, por ejemplo, un análogo de ligando de RP o RG, más particularmente una antiprogestina modificada (por ejemplo una MFP modificada) o una mesoprogestina modificada (por ejemplo una asoprisnil modificada) administrado por vía oral a un sujeto, y el único vector que codifica una MT y MR son vector único administrado por inyección o por electroporación a células de un sujeto (por ejemplo, células musculares esqueléticas). Otros ejemplos de un medio adecuado para administrar una composición de la presente invención incluye el suministro *ex vivo* de la composición, por ejemplo, un vector de ácido nucleico que codifica una MT y/o MR, a las células de un sujeto y después el suministro de las células tratadas al sujeto, de tal manera que la molécula codificada se expresa en las células en el sujeto (véase por ejemplo, Studeny y col. (2004) *J Natl Cancer Inst* 96(21): 1593-1603; Studeny y col. (2002) *Cancer Res* 62(13): 3603-3608).

El sistema de expresión regulado de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen terapéutico (por ejemplo, el gen IFN- $\beta$ ) que se administra a un sujeto mediante inyección. Como se usa en el presente documento, "gen terapéutico" se refiere a un gen que codifica una MT, por ejemplo, una proteína que tiene una actividad terapéutica (por ejemplo, IFN- $\beta$  1a o 1b). En una realización particular, el gen es IFN- $\beta$  1a y se administra como una sola inyección intramuscular periódicamente, por ejemplo, de 3 a 6 meses usando un vector de la presente invención. En otras realizaciones, un gen terapéutico se administra cada 1-3 meses, de 3 a 6 meses, de 6 a 9 meses o de 9 a 12 meses. En otra realización, la regulación de los niveles en circulación de la proteína expresada se consigue por inducción controlada de un promotor que dirige la expresión de la proteína codificada en las células o tejido del sujeto diana.

La MR es un activador de molécula pequeña en forma de píldora disponible por vía oral que controla la inducción del promotor y la expresión posterior de una MT y, más particularmente, un gen terapéutico. De esta manera el nivel de MT expresado (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico), en la circulación puede regularse estrechamente de una

manera activada/inactivada y/o de una manera dependiente de la dosis. Por tanto, el sistema de expresión regulado de la presente invención permite por primera vez la opción de una terapia continua frente a pulsátil de una MT (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico) y la modulación de los niveles de expresión de una MT, para optimizar la eficacia terapéutica de una MT minimizando al mismo tiempo cualquiera de los efectos secundarios de los mismos.

5 En particular, el sistema de expresión regulado de la presente invención permite por primera vez la opción de una terapia con MT continua frente a pulsátil en sujetos y, más particularmente, permite una terapia específica para el sujeto modulando y optimizando los niveles de expresión de una MT en células del sujeto para conseguir una eficacia terapéutica máxima y mínimos efectos secundarios para el tratamiento de una enfermedad.

10 Usando el sistema de expresión regulado de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican una MT (por ejemplo, una proteína o ácido nucleico) pueden administrarse a células diana de un sujeto para el tratamiento de una enfermedad. Más particularmente, usando el sistema de expresión regulado de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican una MT pueden suministrarse a células diana de un sujeto de tal manera que la MT expresada se proporciona en una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, una “dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” de una MT de la presente invención es una  
15 dosis o una cantidad que, cuando está presente en las células de un sujeto que necesita el tratamiento de una enfermedad, da como resultado un beneficio terapéutico hacia el sujeto (es decir da como resultado el tratamiento de la enfermedad). Además, una cantidad o dosis adecuada de un ácido nucleico que codifica una MT administrada a un sujeto o presente en las células de un sujeto; o una cantidad o dosis de una MR, MA o MI, o un ácido nucleico que codifica una MR, MA o MI que se administra a y/o está presente en las células de un sujeto, que da como resultado la presencia de una MT en las células de un sujeto y/o una cantidad terapéuticamente eficaz de la MT, puede determinarla empíricamente un experto en la materia. Por ejemplo, en una realización una dosis o cantidad adecuada de una MR o un ácido nucleico que codifica una MR, administrada a un sujeto, es una dosis o cantidad que regula (por ejemplo induce) la expresión y/o actividad de una MT en las células de un sujeto de tal manera que se consiga una dosis terapéuticamente eficaz.

25 Los factores que influyen en la cantidad de la MT que constituye una dosis terapéuticamente eficaz incluyen, pero sin limitación la gravedad y el historial de la enfermedad que vaya a tratarse y de la edad, salud y estado físico del sujeto sometido a terapia. Una dosis terapéuticamente eficaz de una MT de la presente invención también puede depender de la frecuencia de dosificación y de la gravedad de la enfermedad en el sujeto sometido a tratamiento. El régimen de dosificación de una MT de la presente invención puede continuarse siempre y cuando se requiera conseguir el efecto deseado, es decir, por ejemplo, prevención y/o mejora de la enfermedad, síntomas asociados con la enfermedad, gravedad de la enfermedad y/o periodicidad de la recurrencia de la enfermedad como se describe en el presente documento. En una realización, el régimen de dosificación es continuado durante un periodo de hasta un año a indefinidamente, tal como durante un mes a 30 años, aproximadamente tres meses a aproximadamente 20 años, de aproximadamente 6 meses a aproximadamente 10 años.

35 Ejemplos de ácidos nucleicos adecuados para su uso en el sistema de expresión regulado de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellos ácidos nucleicos que codifican un gen para una hormona, factor de crecimiento, enzima, citocina, receptor o molécula de MHC que tiene una actividad terapéutica. Adicionalmente, los genes adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención, incluyen secuencias de ácido nucleico que son exógenas o endógenas a las células en las que el ácido nucleico que codifica el gen de interés puede introducirse. De particular interés y adecuadas para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención para el tratamiento de enfermedades son aquellos genes que codifican un polipéptido que está ausente, producido en cantidades disminuidas o producido en una forma mutante en aquellos sujetos que tienen o que son susceptibles a padecer una enfermedad genética. Los ejemplos de dichas enfermedades genéticas incluyen, pero sin limitación, retinoblastoma, tumor de Wilms, deficiencia en adenosina desaminasa (ADA), talasemias, fibrosis quística, enfermedad de células falciformes, enfermedad de Huntington, distrofia muscular de Duchenne, Fenilcetonuria, síndrome de Lesch-Nyhan, enfermedad de Gaucher y enfermedad de Tay-Sach.

También de particular interés y adecuadas para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención para el tratamiento de enfermedades son los ácidos nucleicos que codifican un gen supresor tumoral. Los ejemplos de dichos genes supresores tumorales adecuados incluyen, pero sin limitación, retinoblastoma, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, hormona de crecimiento humano (HGH), TNF, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , hemoglobina, interleucinas, factor co-estimulador B7, insulina, factor VIII, factor IX, PDGF, EGF, NGF, EPO y  $\beta$ -globina, así como muteínas biológica o terapéuticamente activas de las proteínas codificadas por dichos genes. Los genes adecuados para el suministro a células diana pueden ser de cualquier especie, pero preferentemente de una especie de mamífero y más preferentemente de un ser humano. Adicionalmente, son especies preferidas, como fuentes de genes adecuados, aquellas especies en las que el gen de interés va a suministrarse usando los procedimientos y composiciones de la presente invención, por ejemplo, una especie de mamífero y preferentemente un ser humano.

Otros ejemplos de ácidos nucleicos adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellos que codifican una proteína o ácido nucleico MT que tienen una actividad antiinflamatoria, antiviral o anticancerosa. Los ejemplos de dichos ácidos nucleicos adecuados, pero sin limitación aquellas que codifican un factor de colonias estimuladoras de granulocitos macrófagos (GM-CSF) o una variante de los mismos (por ejemplo, Leukine<sup>®</sup> o Leu<sup>23</sup>Asp<sup>27</sup>Glu<sup>39</sup> de GMCSF humano) que tiene una actividad anticancerosa (véase por ejemplo, los mutantes GM-CSF de las Patentes de Estados Unidos N° 5.032.676;



5.391.485; y 5.393.870). Además, por ejemplo, los ácidos nucleicos adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos que codifican un interferón que tiene una actividad inflamatoria o antiviral, por ejemplo, un interferón, particularmente IFN- $\beta$  y más particularmente un IFN- $\beta$  1a o IFN- $\beta$  1b.

5 Las composiciones y procedimientos de la presente invención se usan para tratar EM administrando a un sujeto que necesita el tratamiento un ácido nucleico que codifica una MT que es un IFN- $\beta$  y, más particularmente, es IFN- $\beta$  1a, de tal manera que el IFN- $\beta$  se expresa en las células del sujeto y la expresión y/o actividad del IFN- $\beta$  está regulado por una MR como se describe en el presente documento.

10 La EM es una enfermedad crónica y grave caracterizada por inflamación focal en el sistema nervioso central (SNC) (véase por ejemplo, Hemmer y col. (2002) *Neuroscience* 3: 291-301; Keegan y col. (2002) *Ann. Rev. Med.* 53: 285-302; Young, V. Wee (2002) *Neurology* 59: 802-808; Goodin y col. (2001) *Am. Academy of Neurology* 58: 169-178). Una pérdida asociada de la vaina de mielina aislante de alrededor de los axones de las células nerviosas (desmielinización) y una degeneración de los axones también son características notables de la enfermedad. Resultante de la inflamación local, una gliosis astrocítica conduce a la formación de lesiones escleróticas en la materia blanca (véase por ejemplo, Prineas (1985) *Demyelinating Diseases*, Elsevier: Ámsterdam; Raine (1983) *Multiple Sclerosis*, Williams y Wilkins: Baltimore; Raine y col. (1988) *J. Neuroimmunol.* 20: 189-201; y Martin (1997) *J. Neural Transmission (Supl)* 49: 53-67).

20 Existen dos tipos principales de poblaciones de sujetos con EM y en el momento de la aparición de la enfermedad: aquellos sujetos con EM recidivante-remitente y aquellos sujetos con EM progresiva primaria. La EM recidivante-remitente se caracteriza por episodios (denominados recaídas o agravamiento) en el que emergen nuevos déficits neurológicos o empeoran déficits neurológicos preexistentes y periodos de remisión en los que los síntomas clínicos se estabilizan o disminuyen, mientras que los sujetos con EM progresiva primaria padecen deterioro neurológico progresivo sin agravamiento. Una gran proporción de sujetos con EM recidivante/remitente también experimentan durante el curso de su enfermedad un empeoramiento de síntomas neurológicos independientes de recaídas, con o sin recaídas superimpuestas. Una vez que se alcanza esta fase de la enfermedad, esta se denomina EM progresiva secundaria.

30 Se piensa que los síntomas clínicos de la EM son el resultado de una degradación focal en la barrera hematoencefálica (BBB) que permite la entrada de infiltrados inflamatorios en el cerebro y la médula espinal. Además, se piensa que estos infiltrados consisten en diversos linfocitos y macrófagos que conducen a la desmielinización, degeneración axonal y formación de tejido cicatricial y la degeneración de oligodendrocitos indispensables para la producción de mielina del SNC (véase por ejemplo, Martin (1997) *J. Neural Transmission (Supl)* 49: 53-67). Por consiguiente, la mielina aislante nerviosa y la capacidad de las células oligodendrogiales para reparar la mielina dañada están seriamente comprometidas (véase por ejemplo, *Scientific American* 269 (1993): 106-114). Estos síntomas de la EM incluyen dolor y hormigueo en brazos y piernas, entumecimiento localizado y generalizado, espasmos musculares y debilidad, dificultad con el equilibrio cuando se está de pie o se camina, dificultad del habla y deglución, déficits cognitivos, fatiga, y disfunción intestinal y de la vejiga.

40 Aunque actualmente no hay cura para la EM, la terapia inmunomoduladora con interferones se ha probado con éxito en la reducción de la gravedad de enfermedades subyacentes en sujetos con EM. Los interferones son citocinas importantes caracterizadas por actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Estas actividades forman una base para los beneficios clínicos que se han observado en el tratamiento de sujetos con esclerosis múltiple. Los interferones se dividen en las clases de tipo I y tipo II. El IFN- $\beta$  pertenece a la clase de interferones de tipo I, que también incluyen interferones alfa, tau y omega, mientras que el interferón gamma es el único miembro conocido de la distinta clase de tipo II.

45 El IFN- $\beta$  es un polipéptido regulador que tiene un peso molecular de 22 kDa que consiste en 166 restos de aminoácidos. La mayoría de las células pueden producir el polipéptido en el organismo, en fibroblastos particulares, en respuesta a infección o exposición viral hacia otros compuestos biológicos. Adicionalmente, el IFN- $\beta$  se une a un receptor de superficie celular multimérico y la unión al receptor productiva da como resultado una cascada de sucesos intracelulares que conducen a la expresión de genes inducibles por IFN $\beta$  que a su vez producen efectos que pueden clasificarse como antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores.

50 El IFN- $\beta$  humano es un polipéptido bien caracterizado. La secuencia de aminoácidos del IFN- $\beta$  humano se conoce (véase, por ejemplo *Gene* 10: 11-15, 1980, y en los documentos EP 83069, EP 41313 y Patente de Estados Unidos N° 4.686.191). También se han descrito estructuras cristalinas del IFN- $\beta$  humano y murino, respectivamente (véase por ejemplo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11813-11818, 1997. *J. Mol. Biol.* 253: 187-207, 1995; revisado en *Cell Mol. Life Sci.* 54:1203-1206, 1998). Adicionalmente, se han descrito variantes de proteína modificadas genéticamente de IFN- $\beta$  (véase por ejemplo, los documentos WO 9525170, WO 9848018, Patente de Estados Unidos N° 5.545.723, Patente de Estados Unidos N° 4.914.033, documento EP 260350, Patente de Estados Unidos N° 4.588.585, Patente de Estados Unidos N° 4.769.233, Stewart y col, *DNA Vol. 6* N° 2 1987 páginas 119-128, Runkel y col, 1998, *Jour. Biol. Chem.* 273, No. 14, páginas 8003-8008). Además, la expresión de IFN- $\beta$  en células CHO se ha descrito (véase por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.966.843, 5.376.567 y 5.795.779). Adicionalmente, se describen proteínas de fusión de IFN- $\beta$ , por ejemplo, en el documento WO 00/23472.

Se han aprobado preparaciones comerciales de IFN-β para el tratamiento de sujetos con EM y se comercializan con el nombre de Betaseron® (denominado también Betaferon® o IFN-β 1 b<sub>ser17</sub>, que es un no-glicosilado, producido usando células bacterianas recombinantes, tiene una delección en el resto de metionina N-terminal y la mutación C17S), Avonex® y Rebif® (denominados también IFN-β 1a, que es un glicosilado, producido usando células de mamífero recombinante. Adicionalmente, una comparación de IFN-β 1a e IFN-β 1 b con respecto a la estructura y función se ha presentado en Pharm. Res. 15:641-649, 1998).

El IFN-β es la primera intervención terapéutica observada que retrasa el progreso de la EM. Además, se ha demostrado que la dosis aprobada de la IFN-β es eficaz reduciendo la tasa de agravamiento de la EM, y más sujetos permanecen sin agravamiento durante periodos de tiempo prolongados en comparación con los sujetos tratados con placebo. Adicionalmente, la tasa de acumulación de la discapacidad se reduce (véase por ejemplo, Neurol. 51: 682-689, 1998).

El IFN-β tiene efectos inhibidores sobre la proliferación de leucocitos y presentación de antígenos. Adicionalmente, el IFN-β puede modular el perfil de la producción de citocinas hacia un fenotipo antiinflamatorio. Finalmente, el IFN-β puede reducir la migración de linfocitos T inhibiendo la activación de las metaloproteasas de la matriz de linfocitos T. Dichas actividades de IFN-β probablemente actúen en concierto para explicar el efecto beneficioso de IFN-β en el tratamiento de sujetos con EM (véase por ejemplo, Neurol. 51: 682-689, 1998).

En una realización preferida, las composiciones y procedimientos de la presente invención son para su uso en el tratamiento de sujetos que padecen diversas formas clínicamente reconocidas de EM, incluyendo pero sin limitación, EM recidivante remitente, diferentes tipos de EM progresiva (incluyendo, pero sin limitación, EM progresiva primaria y secundaria, EM progresiva recidivante) y además, síndromes clínicamente aislados sugerentes de EM.

Como se usa en el presente documento, EM "recidivante-remitente" es una evolución clínica de la EM que se caracteriza por empeoramientos o recaídas esporádicos bien definidos, durante los cuales los síntomas existentes se hacen más graves y/o aparecen nuevos síntomas. Dichos empeoramientos o recaídas pueden seguirse de una recuperación parcial o una recuperación y remisión completa. El tiempo de duración entre estos empeoramientos o recaídas esporádicos puede ser de meses o años, tiempo durante el cual las lesiones inflamatorias, la desmielinización, pérdida axonal y formación de tejido cicatricial puede continuar. La EM recidivante-remitente es la fase inicial más común de la EM y se ha descrito que aproximadamente el 50 % de los casos tienen una progresión dentro de 10 a 15 años y otro 40 % dentro de 25 años de aparición.

Como se usa en el presente documento, EM "primaria progresiva" es una evolución clínica de EM que se caracteriza desde el principio por una enfermedad progresiva, sin estabilizaciones ni remisiones o una estabilización ocasional y mejoras pequeñas de corta vida. A medida que avanza la enfermedad, el sujeto puede experimentar dificultad al caminar, constante disminución de las habilidades motoras, y un aumento de las discapacidades durante muchos meses y años, generalmente, en ausencia de aquellos característicos ataques inflamatorios distintos de EM recidivante-remitente.

Como se usa en el presente documento, una EM "secundaria progresiva" es una evolución clínica de la EM que inicialmente es recidivante/remitente y después se hace progresiva a una velocidad variable independientemente de las recaídas. Aunque los sujetos que experimentan este tipo de EM pueden continuar experimentando ataques o empeoramientos inflamatorios, eventualmente los empeoramientos y periodos de remisión pueden disminuir, tomando la enfermedad la disminución característica observada con la EM progresiva primaria.

Como se usa en el presente documento, EM "progresiva-recidivante" es una evolución clínica de la EM que puede presentar deterioro neurológico permanente a partir de la aparición de la enfermedad, pero con claros empeoramientos agudos o recaídas que pueden parecer una EM recidivante-remitente. Para estos sujetos, las funciones perdidas pueden no recuperarse nunca. Se ha descrito que este tipo de EM tiene una tasa de mortalidad elevada si no se trata.

Los síndromes clínicamente aislados sugerentes de EM incluyen, pero sin limitación la esclerosis múltiple de aparición temprana y la EM monosintomática. Para los fines de la presente invención, la expresión "esclerosis múltiple" pretende incluir cada una de estas manifestaciones clínicas de la enfermedad y síndromes clínicamente aislados sugerentes de EM salvo que se especifique de otra manera. Por ejemplo, un sujeto que padece una EM o síntomas asociados con EM en un sujeto que necesita tratamiento de EM o síntomas asociados de EM. En una realización, cuando un sujeto que padece EM se somete a un tratamiento de acuerdo con las composiciones farmacéuticas y procedimientos de la presente invención, el tratamiento puede dar como resultado la prevención y/o la mejora de los síntomas de la enfermedad de EM, gravedad de la enfermedad y/o periodicidad de la recurrencia de la enfermedad, es decir, el tratamiento de EM usando las composiciones y procedimientos de la presente invención puede dar como resultado la prolongación del periodo de tiempo entre episodios en los que brotan los síntomas y/o pueden suprimir la respuesta inmunitaria o autoinmunitaria en curso asociadas con la enfermedad, que, si no se trata, puede potenciar la progresión y la discapacidad de la enfermedad.

Adicionalmente, un sujeto puede tratarse previamente con una composición farmacéutica o puede ser un sujeto sin tratar que no se haya tratado previamente con una composición farmacéutica, antes del tratamiento usando una

composición farmacéutica o procedimiento de la presente invención. Por ejemplo, para el tratamiento de EM, un sujeto previamente tratado puede ser uno que se ha tratado previamente con un fármaco de la proteína IFN- $\beta$  (por ejemplo, IFN- $\beta$  1a) o una variante de IFN- $\beta$  (por ejemplo, IFN- $\beta$  1b), antes del tratamiento con las composiciones o procedimientos de la presente invención. Por ejemplo una dosis aprobada de Betaseron<sup>®</sup>, Avonex<sup>®</sup> o Rebif<sup>®</sup> puede usarse para sujetos previamente tratados. Por tanto, las composiciones farmacéuticas y los procedimientos de la presente invención son adecuados para su uso en el tratamiento de sujetos previamente tratados y no tratados.

Las composiciones farmacéuticas y procedimientos de la presente invención también pueden usarse para bloquear o reducir el deterioro fisiológico o patogénico asociado con la enfermedad, por ejemplo, respuesta inflamatoria en el cerebro y otras regiones del sistema nervioso, degradación o alteración de la barrera hematoencefálica, aparición de lesiones en el cerebro, destrucción tisular, desmielinización, respuesta inflamatoria autoinmune, respuesta inflamatoria aguda o crónica, muerte neuronal y/o muerte neuroglial. Los efectos beneficiosos de las composiciones farmacéuticas y procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, prevenir la enfermedad, desacelerar la aparición de una enfermedad establecida, mejorar síntomas de una enfermedad, reducir un grado de empeoramiento, reducir la progresión de la enfermedad y posponer o prevenir la discapacidad incluyendo disminución cognitiva, pérdida de empleo, hospitalización y, finalmente, muerte. La recurrencia episódica de un tipo particular de enfermedad (por ejemplo EM), puede tratarse, por ejemplo disminuyendo la gravedad de los síntomas (tal como los síntomas descritos anteriormente) asociados con el episodio o prolongando el periodo de tiempo entre la aparición de episodios, por ejemplo días, semanas, meses o años en los que los episodios pueden caracterizarse por un empeoramiento y agravamiento de síntomas de la enfermedad o prevención o reducción de la aparición de lesiones inflamatorias cerebrales por ejemplo en EM (véase por ejemplo, Adams (1993) Principles of Neurology, página 777, para una descripción de lesiones inflamatorias neurológicas).

Adicionalmente, ácidos nucleicos adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención, pueden codificar una MT que sea una proteína de fusión o quimérica, o un ácido nucleico de fusión o quimérico (por ejemplo, ARN). En algunas realizaciones, una MT de la presente invención puede regular la expresión de un producto génico o bloquear una o más etapas en una ruta biológica (por ejemplo, una ruta séptica) y, por lo tanto, proporcionar un beneficio terapéutico. Adicionalmente, el ácido nucleico puede codificar una toxina fusionada con una MT (por ejemplo, un gen ligando de receptor o un anticuerpo que dirige la toxina fusionada a una diana tal como una célula tumoral o un virus) y, por lo tanto, tener un efecto terapéutico. En el presente documento y en la técnica se describen procedimientos convencionales para insertar operativamente y/o fusionar, secuencias de ácido nucleico o insertar y/o secuencias de aminoácidos en secuencias de aminoácidos de la presente invención (véase por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel y col. (eds.), Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley and Sons (1987)).

En la técnica se conocen efectos adversos debidos a algunos regímenes de tratamiento de enfermedades (véase por ejemplo, Munschauer y col., (1997) Clinical Therapeutics 19(5): 883-893; Walther y col. (1999) Neurology 53: 1622-1627; Lublin y col. (1996) 46: 12-18; Bayas y col. (2000) 2: 149-159; Ree y col. (2002) 8: 15-18; Walther y col. (1998) 5(2): 65-70). Por ejemplo, algunos de los efectos adversos debido al tratamiento de EM incluyen, pero sin limitación, por ejemplo síntomas similares a la gripe; espasticidad aumentada o deterioro de síntomas neurológicos; trastornos menstruales, anomalías en el laboratorio (por ejemplo, recuento sanguíneo/valor de hemoglobina, leucocitos, granulocitos, linfocitos o trombocitos anómalo); valor de laboratorio anómalo para enzimas hepáticas (por ejemplo bilirrubina, transaminasas o fosfatasas alcalinas); reacciones en los sitios de inyección (por ejemplo, inflamación, dolor o eritema); necrosis cutánea o subcutánea y depresión. Las co-medicaciones adecuadas y el uso de estas co-medicaciones junto con las composiciones y procedimientos de la presente invención, para el tratamiento de efectos adversos debidos al tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, EM) puede determinarse de acuerdo con las co-medicaciones generalmente conocidas en la técnica para el tratamiento de dichos efectos (véase por ejemplo, Munschauer y col., (1997) Clinical Therapeutics 19(5): 883-893; Walther y col. (1999) Neurology 53: 1622-1627; Lublin y col. (1996) 46: 12-18; Bayas y col. (2000) 2: 149-159; Ree y col. (2002) 8: 15-18; Walther y col. (1998) 5(2): 65-70). Las dosis y regímenes de dosificación para dichas co-medicaciones también son generalmente conocidas. Dichas co-medicaciones son bien conocidas en la técnica y pueden incluir, pero sin limitación, por ejemplo, aquellas que ayudan a aliviar o mitigar efectos adversos debidos a una enfermedad o debidos al tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de dichas co-medicaciones incluyen, pero sin limitación, analgésicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y esteroides.

Otros ejemplos adecuados de co-medicaciones también incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, ibuprofeno, acetaminofén, ácido acetilsalicílico, prednisona, pentoxifilina, baclofeno, esteroides, agentes antibacterianos y antidepresivos (véase por ejemplo, Walther y col. (1999) Neurology 52: 1622-1627). Por ejemplo pueden tratarse síntomas similares a la gripe con los AINE (por ejemplo ibuprofeno o ácido acetilsalicílico) o con paracetamol o pentoxifilina; la espasticidad o deterioro aumentados de síntomas neurológicos también puede tratarse con AINE y/o relajantes musculares (por ejemplo, baclofeno); los trastornos menstruales pueden tratarse con anticonceptivos orales; las reacciones en los sitios de inyección pueden tratarse con AINE sistémicos y/o esteroides (por ejemplo hidrocortisona); la necrosis cutánea o subcutánea puede tratarse con agentes antibacterianos y la depresión puede tratarse con antidepresivos (véase por ejemplo, Walther y col. (1999) Neurology 53: 1622-1627).

Las terapias de combinación con otros fármacos, que son eficaces en el tratamiento de una enfermedad particular y tienen un perfil eventual adverso diferente, pueden aumentar el efecto del tratamiento y nivelar el perfil de acontecimientos adversos. Para el tratamiento de EM, los ejemplos de terapias de combinación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, acetato de glatiramer (Copaxona), mitoxantrona, ciclofosfamida, ciclosporina A, cladribina, anticuerpos monoclonales (por ejemplo Campath-H1® o Antegren®/Natazulimab®) y estatinas.

El tratamiento eficaz de enfermedades en un sujeto usando los procedimientos de la invención puede examinarse de diversos modos alternativos, incluyendo, la puntuación EDSS (escala expandida del estado de discapacidad), puntuación compuesta funcional, ensayo cognitivo, aspecto de agravamientos o MRI, por ejemplo, para el tratamiento de EM. La EDSS es un medio para clasificar el deterioro clínico debido a EM (véase por ejemplo, Kurtzke (1983) *Neurology* 33: 1444). Ocho sistemas funcionales, la amplitud del paso, la capacidad para caminar y la capacidad de mantener funciones de cuidado propio, se evalúan para el tipo y gravedad de disfunción neurológica. Por ejemplo, antes del tratamiento, se evalúa la disfunción en los siguientes sistemas: piramidal, cerebelar, encefálico, sensorial, intestino y vejiga, visual, cerebral y otros. Junto con la evaluación de la amplitud del paso, de la capacidad para caminar con o sin dispositivos de ayuda y la capacidad de mantener funciones de cuidado propio se calcula la puntuación EDSS final. Después se obtienen puntuaciones de seguimiento a intervalos definidos de tratamiento. El grado de la escala puede variar, por ejemplo de 0 (normal) a 10 (muerte debido a EM). Un aumento de una etapa completa (o media etapa en la puntuación EDSS de línea basal superior) puede definir una progresión de la enfermedad (véase por ejemplo, Kurtzke (1994) *Ann. Neurol.* 36:573-79, Goodkin (1991) *Neurology.* 41: 332.).

Para el tratamiento de la EM, los empeoramientos pueden definirse como la aparición de un nuevo síntoma que puede atribuirse a EM y acompañarse por una nueva anomalía neurológica (véase por ejemplo, el Grupo de Estudio de EM de IFN-β). Los empeoramientos normalmente duran al menos 24 horas y están precedidos por estabilidad o mejoría durante al menos 30 días o una separación de al menos 30 días desde la aparición del último suceso. Los exámenes neurológicos convencionales pueden dar como resultado que los empeoramientos se clasifiquen como de medio, moderado o grave de acuerdo con los cambios en una escala de clasificación neurológica (véase por ejemplo, Sipe y col. (1984) *Neurology* 34: 1368), y/o cambios en la puntuación de EDSS o evaluación de la opinión del médico. Una tasa de empeoramiento anual (u otras mediciones para la frecuencia de recaídas, como por ejemplo un cociente de riesgos de recaídas recurrentes), la proporción de sujetos sin agravamiento y otras mediciones basadas en recaída para la actividad de la enfermedad se determinan después y se evalúa la eficacia de la terapia entre el grupo de tratamiento y el grupo de placebo para cualquiera de estas medidas.

Adicionalmente, son vectores adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención para el tratamiento de enfermedades aquellos que tienen una toxicidad inmunológica mínima, por ejemplo, el plásmido o vectores AAV. Por ejemplo, los vectores plasmídicos que codifican TGF-β o IL-4, bajo el control de un promotor del CMV, supuestamente protegen a los ratones de la EAE inducida por la proteína básica de mielina (PBM) con una toxicidad inmunológica mínima (véase por ejemplo, C.A. Piccirillo y G.J. Prud'homme (1999) *Human Gene Therapy* 10: 1915-22)). Adicionalmente, diversos vectores y tejidos diana son supuestamente adecuados para su uso para la expresión de citocinas en un modelo de EAE, incluyendo un vector de tipo-1 del herpes simple (HSV) no replicativo que expresa antagonistas de IL-4, IL-10 o IL-1 después de administración intratecal (véase por ejemplo, G. Martino y col. (2000) *J. Neuroimmunol* 107: 184-90).

Para diagnosticar y gestionar el tratamiento de enfermedades también se pueden utilizar diversas tecnologías nuevas (por ejemplo, EM). Por ejemplo, puede usarse la exploración por formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) como un indicador simultáneo de enfermedad y actividad de la enfermedad, y también puede usarse como una herramienta de diagnóstico (véase por ejemplo, Paty y col (1993) *Neurology* 43: 662-667; Frank y col. (1994) *Ann. Neurology* 36(supl.): S86-S90; (1995) *Neurology* 45: 1277-1285; Filippi y col. (1994) *Neurology* 44: 635-641). Por ejemplo, para el tratamiento de EM, puede usarse MRI para medir lesiones activas usando, por ejemplo, formación de imágenes ponderadas con T1 potenciadas con gadolinio-DTPA (véase por ejemplo, McDonald y col. (2001) *Ann. Neurol.* 50: 121-127) o la localización y alcance de lesiones usando técnicas ponderadas con T2 y ponderadas con T1. Las MRI de línea basal pueden obtenerse y, después de esto, puede usarse los mismos planos de formación de imágenes y posición del sujeto para cada estudio posterior. Para la EM, las áreas de las lesiones pueden destacarse y adicionarse corte por corte para un área de lesión total y pueden examinarse diversos criterios, por ejemplo: 1) pruebas de nuevas lesiones; 2) tasa de aspecto de lesiones activas o nuevas lesiones y 3) cambio en el área de lesión o volumen de lesión (véase por ejemplo, Paty y col. (1993) *Neurology* 43: 665). Por tanto, la mejora debida a terapia puede después establecerse, por ejemplo, cuando existe una mejora estadísticamente significativa en un sujeto individual en comparación con una línea basal o en un grupo tratado frente a un grupo placebo.

#### **Formulación y administración de composiciones**

En realizaciones preferidas, las composiciones de ácido nucleico de la presente invención se formulan para la administración o el suministro a las células de un sujeto. Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención se formulan con polímeros no iónicos y/o aniónicos. Dichos polímeros pueden potenciar la eficacia de la transfección y la expresión de moléculas codificadas por el ácido nucleico y proteger al ácido nucleico de la degradación. Por tanto, en algunas realizaciones en las que la eficacia o expresión de la transfección está

potenciada usando composiciones de ácido nucleico formuladas de la presente invención, pueden usarse cantidades disminuidas de la composición de ácido nucleico (por ejemplo, un vector que codifica una molécula de la presente invención, por ejemplo, una MT y/o una MR de la presente invención). Como se usa en el presente documento, “polímeros biodegradables”, se refiere a polímeros que pueden metabolizarse o eliminarse *in vivo* por un sujeto y que tienen ninguno o mínimos efectos tóxicos o efectos secundarios en el sujeto.

“Polímeros aniónicos” como se usa en el presente documento se refiere a polímeros que tienen una subunidad de repetición que incluye, por ejemplo, un grupo carboxilo, fosfato o sulfato ionizado que tiene una carga negativa neta a pH neutro. Los ejemplos de polímeros aniónicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, poliaminoácidos (por ejemplo ácido poliglútamico, ácido poliaspártico y sus combinaciones), ácidos polinucleicos, ácido poliacrílico, ácido poligalacturónico y sulfato polivinílico. En algunas realizaciones, en las que el polímero es un ácido polimérico, el polímero se utiliza como una forma de sal. Los ejemplos de otros polímeros incluyen, pero sin limitación PVP, PVA y quitosano. Como se usa en el presente documento, “ácido poli-L-glutámico” se usa de manera intercambiable en el presente documento con “sal sódica del ácido poli-L-glutámico”, “poli-L-glutamato sódico” y “poli-L-glutamato. El “poli-L-glutamato” como se usa en el presente documento se refiere a una sal de sodio del ácido poli-L-glutámico. Adicionalmente, en realizaciones preferidas el estereoisómero L del ácido poliglútamico se usa en las composiciones de la presente invención, pero, en otras realizaciones, son adecuadas otras mezclas estereoisómeras o racémicas de isómeros para su uso en las composiciones de la presente invención. Adicionalmente, en algunas realizaciones son adecuadas otras sales de polímeros de aminoácidos aniónicos para su uso en las composiciones de la presente invención.

La expresión “polímeros de aminoácidos aniónicos” como se usa en el presente documento se refiere a formas poliméricas de un aminoácido aniónico determinado, por ejemplo, un ácido poliglútamico o ácido poliaspártico. En algunas realizaciones, los polímeros formados de una mezcla de aminoácidos aniónicos, por ejemplo ácido glutámico y ácido aspártico, pueden ser igualmente adecuados para su uso en composiciones de la presente invención.

En la técnica se conocen generalmente procedimientos para la formulación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences 18. sup. ed.: Mack Pub. Co.: Eaton, Pa. 1990, para un análisis minucioso sobre la formulación y selección de transportadores, estabilizadores e isomolitos farmacéuticamente adecuados (véase también, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.588.585; 5.183.746; 5.795.779 y 5.814.485; Solicitudes de Estados Unidos N° 10/190.838, 10/035.397; y Solicitud PCT Internacional N° PCT/US02/21464 y PCT/US01/51074).

En las composiciones farmacéuticas y procedimientos de la presente invención pueden usarse un vehículo y otros componentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, co-medicaciones). Como se usa en el presente documento, un “transportador farmacéuticamente aceptable” es un transportador o diluyente que se usa convencionalmente en la técnica para facilitar el almacenamiento, administración y/o el efecto deseado de los principios terapéuticos de la composición farmacéutica. Un transportador también puede reducir los efectos secundarios no deseables de la administración o administrar a un sujeto una composición farmacéutica de la presente invención. Un transportador adecuado es preferentemente estable, por ejemplo, incapaz de reaccionar con otros principios en la formulación. Adicionalmente, un transportador adecuado preferentemente no produce un efecto adverso local o sistémico significativo en un sujeto a las dosis y concentraciones empleadas para la terapia. Dichos transportadores se conocen generalmente en la técnica.

Transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados son, por ejemplo, disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos, microcápsulas, liposomas, transportadores lipídicos catiónicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción y similares que no son componentes incompatibles de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias eficaces o terapéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los principios activos complementarios pueden también incorporarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención y usarse en los procedimientos de la presente invención.

Son ejemplos adicionales de transportadores farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención macromoléculas grandes estables tales como albúmina, gelatina, colágeno, polisacárido, monosacáridos, polivinilpirrolidona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, aminoácidos poliméricos, aceites no volátiles, etil oleato, liposomas, glucosa, sacarosa, lactosa, manosa, dextrana, dextrano, celulosa, manitol, sorbitol, polietilenglicol (PEG), alginato de heparina y similares. Los transportadores de liberación lenta, tales como ácido hialurónico, también pueden ser adecuados.

Agentes estabilizantes tales como albúmina de suero humano (HSA), manitol, dextrana, trehalosa, tioglicerol, y ditiotreitil (DTT) también pueden añadirse a las composiciones farmacéuticas de la presente invención para potenciar su estabilidad. Los agentes estabilizantes adecuados incluyen pero sin limitación ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) o una de sus sales tales como EDTA disódico; ésteres de polioxietileno de sorbitol, por ejemplo polisorbato 80 (TWEEN 80), polisorbato 20 (TWEEN 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno por ejemplo Pluronic F68 y Pluronic F127; alcoholes de polioxietileno, por ejemplo, Brij 35; semeticona; polietilenglicol, por ejemplo, PEG400; lisofosfatidilcolina y polioxietileno-p-t-octifenol por ejemplo Triton X-100. La estabilización de

composiciones farmacéuticas por tensioactivos es generalmente conocida en la técnica (véase por ejemplo, Levine y col. (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3): 160-165).

Otros componentes aceptables de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir, pero sin limitación, tampones que potencian la isotonicidad tales como agua, solución salina, fosfato, citrato, succinato, ácido acético, aspartato y otros ácidos orgánicos o sus sales. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un agente tonificante no iónico en una cantidad suficiente para hacer que la composición sea isotónica con los fluidos corporales. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden hacerse isotónicas con diversos agentes modificantes no iónicos de la tonicidad generalmente conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, carbohidratos de diversas clasificaciones (véase, por ejemplo Voet y Voet (1990) *Biochemistry* (John Wiley & Sons, Nueva York); monosacáridos clasificados como aldosas (por ejemplo, glucosa, manosa, arabinosa) y ribosa, así como los clasificados como cetosas (por ejemplo, fructosa, sorbosa y xilulosa); disacáridos (por ejemplo sacarosa, maltosa, trehalosa y lactosa); y alditoles (alcoholes de polihidroxi acíclicos) por ejemplo, glicerol, manitol, xilitol y sorbitol. En una realización preferida, los agentes no iónicos tonificantes son trehalosa, sacarosa y manitol o una combinación de los mismos.

Preferentemente, el agente tonificante no iónico se añade en una cantidad suficiente para hacer que la formulación sea isotónica con los fluidos corporales. Cuando se incorpora en una composición farmacéutica de la presente invención (incluyendo, por ejemplo, una composición farmacéutica sin HSA), el agente tonificante no iónico está presente a una concentración de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %, dependiendo del agente usado (véase por ejemplo, las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 10/190.838, 10/035.397; y la Solicitudes PCT Internacional N° PCT/US02/21464 y PCT/US01/51074).

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas preferidas de la presente divulgación pueden incorporar tampones que tienen un dolor e irritación local reducidos resultantes de inyección, o mejoran la solubilidad o estabilidad de un componente de las composiciones farmacéuticas de la presente invención (por ejemplo, que comprende y/o que codifica una MT, MR, MA y/o MI). Dichos tampones incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, tampones con baja cantidad de fosfato, aspartato y succinato.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender adicionalmente un compuesto solubilizante o una formulación que es capaz de potenciar la solubilidad de los componentes de las composiciones. Los compuestos solubilizantes adecuados incluyen, por ejemplo, compuestos que contienen un grupo guanidinio, preferentemente arginina. Otros ejemplos de compuestos solubilizantes adecuados incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, el aminoácido arginina, o análogos de aminoácidos de arginina que conservan la capacidad de potenciar la solubilidad de una mutéina de IFN- $\beta$  de la presente invención. Los ejemplos de dichos análogos de aminoácidos incluyen pero sin limitación, por ejemplo, dipéptidos y tripéptidos que contienen arginina. Otros ejemplos de compuestos solubilizantes adecuados se analizan por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.440; 4.894.330; 5.005.605; 5.183.746; 5.643.566; y en Wang y col. (1980) *J. Parenteral Drug Assoc.* 34: 452-462).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención (por ejemplo, que comprenden y/o codifican una MT, MR, MA y/o MI) se formulan en una dosificación unitaria y una forma inyectable tal como una solución, suspensión o emulsión o en forma de un polvo liofilizado, que puede convertirse en solución, suspensión o emulsión antes de la administración. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden esterilizarse por filtración a través de membrana, que también retira agregados, y conservarse en envases monodosis o multidosis tales como viales, ampollas o jeringas herméticas.

Una MA o MI de la presente invención se formula para administración oral. En una realización, los ácidos nucleicos que codifican una MT y/o MR de la presente invención se formulan para la administración por inyección o electroporación y una MA y/o MI de la presente invención se formula para administración oral. Por ejemplo, en una realización preferida, el sistema de expresión regulado de la presente invención comprende un solo vector que codifica al menos una MT y una MR formulada para la administración mediante inyección o electroporación a las células de un sujeto, y una MA que se formula para administración oral al sujeto, de tal manera que la presencia de la MA en la célula del sujeto activa la MR y por lo tanto la MR induce la expresión de la MT en las células del sujeto.

Las composiciones farmacéuticas líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización de la presente divulgación pueden prepararse como se conoce en la técnica, por ejemplo, como una solución o una suspensión acuosa o no acuosa para la administración posterior a un sujeto de acuerdo con los procedimientos de la invención. Cada una de estas composiciones farmacéuticas puede comprender un componente terapéutica o profilácticamente eficaz o activo. Como se usa en el presente documento, un componente terapéutica o profilácticamente "eficaz" o "activo" es una cantidad de una molécula de la presente invención (por ejemplo, que comprende y/o que codifica una MT, MR, MA y/o MI) que está incluida en la composición farmacéutica de la presente invención para realizar una respuesta terapéutica o profiláctica deseada con respecto al tratamiento, prevención o diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto que necesita el tratamiento, usando las composiciones farmacéuticas y procedimientos de la presente invención. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden agentes estabilizantes apropiados, agentes formadores de volumen o las dos cosas para minimizar problemas asociados con la pérdida de actividad biológica o terapéutica durante la preparación y conservación.

La formulación de las composiciones farmacéuticas de la presente invención es preferentemente estable en las condiciones de fabricación y conservación y se conservan frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. Los procedimientos de prevención de contaminación por microorganismos son bien conocidos y pueden conseguirse, por ejemplo, mediante la adición de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos.

Las formas adecuadas de la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Las formas adecuadas son preferentemente estériles y líquidas hasta el punto en que pueden tomarse fácilmente e inyectarse a través de una jeringa. Los transportadores típicos pueden incluir un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, soluciones acuosas tamponadas con agua (es decir, tampones biocompatibles), etanol, polioles, tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, mezclas adecuadas de los mismos, tensioactivos o aceites vegetales. La esterilización puede conseguirse mediante cualquier técnica reconocida en el campo incluyendo pero sin limitación filtración o adición de agentes antibacterianos o antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico o timerosal. Adicionalmente, pueden incorporarse en las composiciones para el sujeto agentes isotónicos tales como azúcares o cloruro sódico.

La producción de soluciones inyectables estériles que contienen una composición farmacéutica de la presente invención pueden conseguirse incorporando la composición en la cantidad deseada en una formulación apropiada con diversos principios (por ejemplo, los indicados en el presente documento), si se desea, y seguido por esterilización. Para obtener un polvo estéril, las soluciones indicadas anteriormente pueden secarse al vacío o liofilizarse si fuera necesario.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden por tanto componerse para una administración conveniente y eficaz en cantidades farmacéuticamente eficaces con un transportador farmacéuticamente aceptable adecuado en una dosis terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz exacta de las composiciones y procedimientos de la presente invención para la aplicación en seres humanos puede determinarla un experto en la materia considerando las diferencias individuales en cuanto a edad, peso, grado de infiltración celular por células inflamatorias y estado del sujeto que padece EM.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente individuales ajustadas como dosificaciones unitarias para sujetos mamíferos que van a tratarse, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido.

Los principios activos principales pueden componerse para una administración conveniente y eficaz en cantidades terapéuticamente eficaces con un transportador adecuado farmacéuticamente aceptable en forma unitaria de dosificación como se describe en el presente documento. Adicionalmente, las co-medicaciones están incluidas en una forma de dosificación unitaria en cantidades generalmente conocidas en la técnica. En el caso de composiciones que contienen principios complementarios activos, por ejemplo, co-medicaciones, las dosificaciones pueden determinarse, por ejemplo, mediante referencia con respecto a la dosis conocida y la manera de administración de los principios.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de cualquier manera que sea médicamente aceptable y puede depender de un tipo o estadio de patología específico o síntomas asociados que vayan a tratarse. Las vías de administración posibles incluyen inyecciones, mediante vías parenterales tales como intravascular, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural u otras, así como oral, nasal, oftálmica, rectal, tópica o mediante inhalación. En una realización preferida, la vía de administración es intramuscular. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía intramuscular cada 3-12 meses. En otra realización preferida, la administración intramuscular es mediante inyección automatizada o manual (por ejemplo, usando una jeringa) de la composición farmacéutica. También se contempla la administración de liberación prolongada, por ejemplo, usando implantes erosionables.

En particular, las composiciones farmacéuticas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden administrarse a las células de un sujeto usando cualquiera de los medios descritos en el presente documento conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, inyección u otros medios adecuados, por ejemplo, los procedimientos de administración de ácidos nucleicos conocidos a las células mediante medios físicos son adecuados para su uso e incluyen, pero sin limitación, electroporación, sonoporación y presión. En algunas realizaciones, la administración de una composición de la presente invención de ácido nucleico es por electroporación y comprende la aplicación de un campo eléctrico por pulsos para crear poros transitorios en la membrana celular y, por lo tanto, una molécula exógena, por ejemplo, una composición de ácido nucleico de la presente invención, se administra a la célula. Se sabe que ajustando el impulso eléctrico generado mediante un sistema electroporético, las moléculas de ácido nucleico pueden encontrar su ruta a través de pasos o poros, en la célula que se crea durante dicho procedimiento (véase por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.704.908, 5.704.908).

Como se usa en el presente documento, un “dispositivo de tensión de impulsos” o “dispositivo de inyección de tensión de impulsos” se refiere a un aparato que es capaz de producir o causar la captación de las moléculas de ácido nucleico en las células de un sujeto emitiendo un pulso de electricidad localizado a las células, haciendo, por lo tanto, que la membrana celular se desestabilice y produzca la formación de pasos o poros en la membrana celular. Los dispositivos convencionales de este tipo son adecuados para su uso para la administración de una composición de ácido nucleico de la presente invención. En algunas realizaciones, el dispositivo se calibra para permitir que un experto habitual en la técnica seleccione y/o ajuste la amplitud de voltaje y/o la duración de la tensión por pulsos deseados y así sucesivamente. Un dispositivo de administración de ácido nucleico por tensión por pulsos puede incluir, por ejemplo, un aparato electroporético como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.439.440, 5.704.908, 5.702.384 y en las publicaciones de patente internacional N° WO 96/12520, WO 96/12006, WO 95/19805 o WO 97/07826.

El material de envasado usado para contener el principio activo de una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender vidrio, plástico, metal o cualquier material inerte adecuado y, preferentemente, es un material de envasado que no reacciona químicamente con ninguno de los principios contenidos en su interior. En una realización, la composición farmacéutica se envasa en un vial de vidrio transparente de un solo uso, y un vial individual que contiene diluyente se incluye en cada vial de fármaco. En otra realización preferida, el diluyente se proporciona en una jeringa (es decir, la jeringa se precarga con el diluyente). En aún otra realización preferida, la composición farmacéutica de la presente invención se proporciona en solución en una jeringa (es decir, la jeringa se precarga con la composición farmacéutica en solución) y está lista para su uso. En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede conservarse bajo refrigeración, entre 2 ° a 8 °C (36 ° a 46 °F). En una realización preferida, la composición farmacéutica se conserva a temperatura ambiente.

### Vectores y kits

La presente divulgación proporciona adicionalmente vectores y kits que comprenden el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención para el tratamiento de enfermedades. En algunas realizaciones, el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención comprende uno o más vectores, y cada vector comprende uno o más casetes de expresión. En una realización, el sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención comprende un solo vector que tiene al menos un casete de expresión y, más preferentemente, al menos dos casetes de expresión.

Vectores adecuados para su uso en el sistema de expresión regulado de la presente invención, incluyen, pero sin limitación, los que son capaces de expresar y codificar MT y/u otra molécula codificada de la presente invención (por ejemplo, MR, MA o MI), cuando se administra a las células de un sujeto. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero sin limitación, los descritos en el presente documento y los conocidos en la técnica, incluyendo vectores para producir vectores virales y no virales (vectores que no producen virus). Por ejemplo, una clase de vectores adecuados utilizan elementos de ADN que proporcionan plásmidos extracromosómicos que se replican de manera autónoma, derivados de virus animales tales como el virus del papiloma bovino, poliomavirus, adenovirus, o el virus SV40. Adicionalmente, vectores conocidos para la producción de virus (véase por ejemplo, Wang, y col., Gene Therapy, 4: 432-441, 1997; Oligino, y col., Gene Therapy 5: 491-496, 1998) pueden modificarse y adaptarse para su uso en el sistema de expresión regulado de la presente invención. Adicionalmente, los vectores de la presente invención pueden modificarse para incluir secuencias funcionales adicionales y unidas operativamente para la expresión óptima de una molécula codificada. Los ejemplos de secuencias funcionales adecuadas incluyen pero sin limitación, secuencias de corte y empalme, de poliadenilación y otros tipos de procesamiento de ARN; y secuencias promotoras transcripcionales, potenciadoras y de terminación. Los vectores de expresión de ADNc adecuados que incorporan dichas secuencias funcionales incluyen los descritos por Okayama, H., Mol. Cell. Biol. 3:280 (1983), y otros.

Como se usa en el presente documento “plásmido” se refiere a una composición que comprende material genético extracromosómico, normalmente de un dúplex circular de ADN que puede replicarse independiente de ADN cromosómico. Los plásmidos pueden usarse como vectores, como se describe en el presente documento. Como se usa en el presente documento “vector” se refiere a una composición (por ejemplo, una construcción de ácido nucleico) que comprende material genético diseñado para dirigir la transformación o transfección de una célula diana. Adicionalmente, un vector puede contener secuencias funcionales múltiples posicional y secuencialmente orientadas con respecto a otras secuencias del vector de tal manera que una molécula codificada de la presente invención puede transcribirse y cuando sea necesario traducirse en las células transfectadas o transformadas. Cuando un vector o un casete de expresión codifica una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT, MR, MR o MI), este comprende los componentes esenciales (por ejemplo, promotor, sitio poli(A), sitios de inicio y de terminación de la transcripción) para la expresión de la molécula codificada en una célula heteróloga (por ejemplo, células de un sujeto) de acuerdo con el sistema de expresión regulado de la presente invención, descrito en el presente documento.

El sistema de expresión regulado mejorado de la presente invención comprende un solo vector que comprende un primer casete de expresión que tiene al menos un sitio de clonación para la inserción de una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, y un segundo casete de expresión que tiene al menos un sitio de clonación para la inserción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una MR. En otra realización, el vector es un



vector para producir virus que codifica una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT y/o MR) para suministrar a las células de un sujeto como se describe en el presente documento, por ejemplo, un plásmido lanzadera y, más particularmente, un plásmido lanzadera AAV-1 (véase, por ejemplo la Tabla 8).

5 El vector es un solo vector plasmídico por ejemplo, pGT1 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 4), pGT2 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 4), pGT3 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 4) o pGT4 (SEC ID N°: 12), en el que cada vector comprende un sitio de clonación múltiple (SEC ID N°: 4) localizado en posición 3' del sitio IVS8 y en posición 5' del poli(A) hGH (por ejemplo, como se representa esquemática en las Figuras 14A-D) o pGT11 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 5), pGT12 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 10 y SEC ID N°: 5), pGT13 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11 y SEC ID N°: 5) o pGT14 (que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 5), en el que cada vector comprende un sitio de clonación múltiple (SEC ID N°: 5) localizado en dirección 3' del sitio IVS8 y en dirección 5' del poli(A) hGH. El vector plasmídico sencillo es por ejemplo pGT79 (SEC ID N°: 59) o un solo vector plasmídico derivado de pGT79, por ejemplo, pGT1003 (que comprende la SEC ID N°: 60), pGT1004 (que comprende la SEC ID N°: 62), pGT1005 (que comprende la SEC ID N°: 64), pGT1006 (que comprende la SEC ID N°: 66), pGT1007 (que comprende la SEC ID N°: 68), pGT1008 (que comprende la SEC ID N°: 70), pGT1009 (que comprende la SEC ID N°: 72), pGT1015 (que comprende la SEC ID N°: 74), pGT1016 (que comprende la SEC ID N°: 76), pGT1017 (que comprende la SEC ID N°: 78), pGT1025 (que comprende la SEC ID N°: 80), pGT1020 (que comprende la SEC ID N°: 82), pGT1021 (que comprende la SEC ID N°: 84), pGT1022 (que comprende la SEC ID N°: 86), pGT1023 (que comprende la SEC ID N°: 88) o pGT1024 (que comprende la SEC ID N°: 90).

20 Los casetes de expresión de la presente invención comprenden secuencias funcionales para la expresión de una molécula codificada de la presente invención, por ejemplo, una MT, MR, MA o MI. En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende al menos una secuencia funcional unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención. Como se usa en el presente documento, "secuencia funcional" se refiere a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que tiene una función o actividad en una célula, por ejemplo, una función o actividad relacionada con la expresión celular, procesamiento o clonación de una molécula o con la actividad biológica o celular o la función de una molécula. Los ejemplos de una secuencia funcional incluyen una secuencia que codifica una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT, MR, MA o MI), promotor, proteína o sitio de unión a ácido nucleico, sitio de corte y empalme, sitio de terminación de la transcripción, dominio regulador (por ejemplo, dominio de activación), sitio de inicio de la transcripción, proteína o sitio de estabilización de ácido nucleico, secuencia intermedia, sitio de enzima de restricción o sitio de clonación, señal de empaquetado viral, u otra señal celular, proteica o de ácido nucleico procesadora o reguladora (por ejemplo, una secuencia de transducción de señal o una secuencia específica de tejido). Ejemplos adicionales de una secuencia funcional son, pero sin limitación, una región no traducida 5' o 3' (por ejemplo, UT12, SEC ID N°: 2), intrón (por ejemplo IVS8, SEC ID N°: 3), sitio de poliadenilación (poli(A)) (por ejemplo, SV40, SEC ID N°: 8 o sitio poli(A) hGH, SEC ID N°: 6) o un sitio de unión a ADN (DBS) (por ejemplo, SEC ID N°: 49).

40 Dichas secuencias funcionales también incluyen, por ejemplo, secuencias que codifican un promotor regulado o un promotor específico tisular que promueve la expresión regulada o específica de tejido, respectivamente, de una molécula codificada por una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a dichas secuencias funcionales en un casete de expresión de la presente invención. Los ejemplos de promotores adecuados incluyen, pero sin limitación, un promotor del CMV, un promotor específico de músculo (por ejemplo el promotor de actina o el promotor de creatina quinasa de músculo (MCK)), un promotor o un elemento (por ejemplo, promotor ELAM o HRE) específico de un estado (por ejemplo, hipoxia o inflamación), promotor constitutivo (por ejemplo, ubiquitina, PGK, o un promotor EF1 $\alpha$ ), un promotor sintético o quimérico (por ejemplo, el promotor CMV/actina), un promotor específico del ciclo celular (por ejemplo, ciclina A o promotor cdc6). En una realización, el promotor es un promotor sensible fisiológicamente, por ejemplo, un promotor sensible a inflamación y, preferentemente, sensible a la presencia de citocinas y quimiocinas u otras moléculas celulares o biológicas que indican la aparición o presencia de una enfermedad o afección. En la siguiente Tabla 1 se proporcionan ejemplos adicionales de promotores adecuados.

**Tabla 1**

Promotor	Plásmido/Fuente	Descripción	Referencia(s)
EF-1 $\alpha$	pdrive-chef1 (InvivoGen)	promotor del EF-1 $\alpha$ de chimpancé	por ejemplo, KimDW, y col. 1990 Gene. 91(2): 217-23; Guo ZS, y col. 1996 Gene Ther. 3(9): 802-810
EF-1 $\alpha$ /RU5	pdrive-chef1ru5 (InvivoGen)	promotor del EF-1 $\alpha$ de chimpancé + 5'UTR de HTLV	por ejemplo, KimDW, y col. 1990 Gene. 91(2): 217-23; Guo ZS, y col. 1996 Gene Ther. 3(9): 802-810; Takebe Y. y col 1998 Mol Cell Bio. 8(1): 466-472
UbiB	pdrive-hubib (InvivoGen)	promotor de ubiquitina B humano	por ejemplo, Ciechanover A. y Schwartz AL. 1998 PNAS 95 (6): 2727-30; Yew NS, y col. 2001 Mol Ther. 4(1): 75-82

(continuación)

Promotor	Plásmido/Fuente	Descripción	Referencia(s)
promotor Sk	pGS1694 (Valentis)	promotor de actina del músculo esquelético + UT12 5'UTR + intrón IVS8	por ejemplo, solicitud N° PCT/US01/30305
promotor MCK	ADN genómico de ratón	Creatina Quinasa de Músculo de Ratón	por ejemplo, Jaynes JB y col, 1986 Mol Cell Biol. agosto; 6(8): 2855-64. Hauser y col 2000, Mol Ther 2: 16-25
EF-1 $\alpha$ /RU5	pORF-htrail (InvivoGen)	EF-1 $\alpha$ humano + 5'UTR de HTLV y promotor bacteriano	por ejemplo, KimDW, y col. 1990 Gene. 91(2): 217-23; Guo ZS, y col. 1996 Gene Ther. 3(9): 802-810; Takebe Y. y col 1998 Mol Cell Bio. 8(1): 466-472
promotor TK	phRL-TK (Promega)	promotor de timidina quinasa del HSV	por ejemplo, Wagner EF y col, 1985 EMBO J (4) 663-6; Stewart CL y col, 1987 EMBO J (6) 383-8

5 En una realización, el sistema de expresión regulada de la presente invención comprende uno o más vectores que comprenden al menos un casete de expresión que tiene una secuencia promotora del CMV que está unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención que es una proteína de fusión o quimérica, y el promotor dirige la expresión de la molécula codificada (por ejemplo, MT, MR, MA o MI). En algunas realizaciones, un promotor adecuado sería uno que proporcionase un nivel de expresión duradero de la molécula codificada en las células de un sujeto. En una realización, un vector de ácido nucleico codifica una molécula de la presente invención (por ejemplo, MT, MR, MA o MI) que está unida operativamente a un promotor que proporciona una expresión duradera en las células de un sujeto, y el vector de ácido nucleico se administra a las 10 células del sujeto mediante electroporación, de tal manera que la molécula se expresa en las células, preferentemente, en el sitio de administración. En una realización preferida, la molécula codificada es una MT.

15 En otra realización, el sistema de expresión regulada de la presente invención comprende uno o más vectores que comprenden un primer casete de expresión que tiene una secuencia promotora que comprende al menos un DBS de GAL-4, unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un MT de la presente invención. En una realización, la secuencia promotora comprende multímeros de DBS de GAL-4, por ejemplo, DBS de GAL-4 3-18.

20 Adicionalmente, los casetes de expresión de la presente invención pueden modificarse adecuadamente para comprender sitios de clonación para la inserción de una secuencia de ácido nucleico deseada. En otra realización, los casetes de expresión de la presente invención comprenden al menos un sitio de clonación, y más preferentemente, un sitio de clonación múltiple (SMC), para la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención, por ejemplo, una MT, MR, MA o MI. Como se usa en el presente documento, "sitio de clonación" se refiere a un sitio enzimático u otro sitio en un ácido nucleico en el que una secuencia de ácido nucleico puede insertarse, estar unido operativamente, o de otra manera conectarse usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, de tal manera que la secuencia funcione para 25 su propósito deseado. En una realización, un primer casete de expresión de la presente invención comprende un SMC para la inserción de una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, e incluye un promotor inducible que comprende al menos un DBS (por ejemplo un DBS de GAL-4 3-18), una región no traducida 5' (por ejemplo, UT12, SEC ID N°: 2), un intrón (por ejemplo, IVS8, SEC ID N°: 3) y un sitio poli(A) hGH (por ejemplo, SEC ID N°: 6), de tal manera que cuando la primera secuencia de ácido nucleico se inserta en el SMC (por ejemplo, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 5), estas secuencias funcionales están unidas operativamente a la primera secuencia de ácido nucleico. En otra realización, un segundo casete de expresión de la presente invención comprende un SMC para la inserción de una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una MR regulada y un sitio poli(A) del SV40 (por ejemplo, la SEC ID N°: 8), de tal manera que cuando la segunda secuencia de ácido nucleico se inserta en el SMC, estas secuencias funcionales están unidas operativamente a la segunda secuencia de ácido nucleico. En una 35 realización preferida, el primer y segundo casetes de expresión están presentes en un solo vector como se ha descrito anteriormente.

Los kits de la presente invención comprenden al menos uno de los sistemas de expresión de la presente invención descritos en el presente documento y, más particularmente, al menos una de las composiciones, vectores o moléculas farmacéuticas (por ejemplo, una MT, MR, MA o MI) de la presente invención e instrucciones para su uso.

#### 40 **Aislamiento y construcción de las composiciones**

Las composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, compuesto químicos, proteínas y ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ADN o ARN), particularmente, ácidos nucleicos que codifican una proteína o ARN. Las composiciones químicas, de ácidos nucleicos y proteínas de la presente invención pueden aislarse, 45 construirse y/o someterse a ensayo usando procedimientos y ensayos convencionales, como se describe en el presente documento o en la técnica.

Una "proteína" o una "molécula de ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a un péptido, una proteína de longitud completa, un fragmento o parte de una proteína de longitud completa. Adicionalmente, una proteína de la presente invención puede ser una molécula de ácido nucleico fusionada, quimérica, modificada, aislada, sintética o recombinante. En particular, los ejemplos de proteínas adecuadas para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención, incluyen, pero sin limitación, una proteína de longitud completa, de tipo natural (incluyendo una forma secretada de la misma), o un análogo, derivado o variante de la misma que tiene una actividad biológica o terapéutica. Más particularmente, las variantes de proteína de la presente invención pueden ser muteínas es decir, que comprenden una mutación por ejemplo, una sustitución, delección o adición de aminoácido sencilla o múltiple de tal manera que la variante conserva o tiene una actividad biológica o terapéutica. Las secuencias que codifican una proteína pueden incluir, por ejemplo, versiones optimizadas por codones de las secuencias de proteína de tipo natural o secuencias humanizadas. El uso de codón óptimo en seres humanos puede identificarse de frecuencias de uso de codones para genes humanos expresados y puede determinarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, el programa "Human High.codN" del Paquete de Análisis de Secuencia Wisconsin, Versión 8.1, Genetics Computer Group, Madison, WI. Por ejemplo, los codones que se usan más frecuentemente en genes humanos altamente expresados pueden ser codones óptimos para la expresión en las células de un sujeto humano y, por tanto, pueden usarse como una base para construir una secuencia codificante sintética.

Como se usa en el presente documento "ácido nucleico" con referencia a una molécula de la presente invención, se refiere a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ADN o ARN, o una proteína fusionada, quimérica, modificada, aislada, sintética o recombinante de la misma. En particular, los ejemplos de ácidos nucleicos adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, un ADN o ARN de longitud completa de tipo natural (por ejemplo, un ARNm) que codifica una proteína u otra molécula de ácido nucleico que tiene una actividad biológica o terapéutica (por ejemplo, un ARNh<sub>c</sub>, ARNi<sub>p</sub>, ribozima, ARN o ADN antisentido, oligonucleótido de ARN o ADN) o un análogo, derivado o variante de los mismos. Más particularmente, las variantes de ácido nucleico de la presente invención pueden ser muteínas, es decir, que comprenden una mutación, por ejemplo, una sustitución, delección o adición de aminoácido sencillo o múltiple de tal manera que la variante conserva o tiene una actividad biológica o terapéutica.

Adicionalmente, las modificaciones de los sistemas de expresión regulados de la presente invención pueden realizarse y someterse a ensayo usando procedimientos y ensayos convencionales, como se describe en el presente documento o en la técnica.

Como se usa en el presente documento "modificado", con referencia a una molécula de la presente invención (por ejemplo, que comprende y/o que codifica una MT, MR, MA y/o MI) se refiere a cualquier reacción o manipulación resultante de un cambio o alteración de un ácido nucleico de referencia, aminoácido o molécula química para llegar a una composición o molécula deseada de la presente invención (por ejemplo, mutación de una proteína o ácido nucleico de tipo natural para llegar a una variante de los mismos deseada que tiene una actividad biológica y/o terapéutica específica; la mutación de una proteína o secuencia de ácido nucleico para llegar a una secuencia humanizada deseada; o una mutación de un compuesto químico para llegar a una estructura química deseada y/o actividad biológica y/o terapéutica). Por ejemplo, los dominios funcionales o secuencias funcionales de una molécula de la presente invención, incluyendo cualquier secuencia unida operativamente a o que codifica una molécula de la presente invención (incluyendo por ejemplo una secuencia vector o una secuencia de control de la transcripción), pueden modificarse para llegar a una composición o molécula deseada de la presente invención.

En particular, el sistema de expresión regulado de la presente invención puede modificarse u optimizarse para conseguir una especificidad particular (por ejemplo, una especificidad para un tejido, afección, enfermedad particular o biomarcador u otra molécula), la rigurosidad o cantidad de regulación, expresión y/o actividad para su uso en el tratamiento de enfermedades, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el sistema de expresión regulado de la presente invención puede modificarse u optimizarse para conseguir tales objetivos aislando o construyendo: 1) MA y MI nuevas o variantes que tengan una especificidad de unión deseada para el LBD de una MR; 2) MR que tengan un DA, LBD nuevo o variante (por ejemplo, que se una a una MA o MI nueva o variante) y/o DBD (por ejemplo, que se una a una secuencia promotora nueva o variante); 3) promotores que tengan actividad que sea altamente específica y sensible a la presencia de una MR particular (por ejemplo, que se activen o inactiven específicamente en presencia de, por ejemplo, la unión de una MR particular); 4) secuencias completamente humanizadas (por ejemplo, secuencias modificadoras que codifican un DBD de GAL-4 y DBS de GAL-4 de tal manera que las secuencias sean completamente humanizadas); 5) un casete de expresión para la expresión de un ARN (por ejemplo, ARNh<sub>c</sub>, ARNi<sub>p</sub>, ribozima, o ARN antisentido), particularmente, una MT de ARN; y 6) modificar una secuencia promotora u otras secuencias funcionales para reducir la expresión no específica, particularmente, de una MT codificada por una secuencia unida operativamente al promotor u otras secuencias funcionales.

El sistema de expresión regulado de la presente invención se modifica de tal manera que la expresión basal de una MT se reduce significativamente para aumentar la seguridad sobre la administración de una MR y, por lo tanto, proporciona un margen aumentado de seguridad en virtud de la expresión de la MT extrínsecamente controlada en lugar de a través de la dependencia sobre la dosis del plásmido administrado. Por ejemplo, una secuencia promotora unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una secuencia que codifica una MT, puede modificarse y optimizarse para el número de copias de un DBS de GAL-4, de tal manera que la sensibilidad del

promotor (y la expresión de la MT resultante) pueda modularse mediante la presencia de (por ejemplo, unión de) una MR que tenga un DBD de GAL-4. Además, por ejemplo, puede construirse un promotor mínimo y modificarse usando procedimientos convencionales y unidos operativamente a una MT para reducir la expresión basal de la MT.

Adicionalmente, la MT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que cuando se suministra a y/o está presente en las células de un sujeto, la MT se expresa a un nivel bajo. En algunas realizaciones, es preferible regular el nivel de la expresión de MT mediante propiedades intrínsecas del ácido nucleico que codifica la MT que se suministra a y/o está presente en las células del sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, dado que el nivel de la expresión basal de la MT en las células de un sujeto aumenta con una cantidad en aumento de ácido nucleico que codifica la MT, puede ser deseable reducir la cantidad de proteína MT expresada en las células del sujeto utilizando un promotor débil.

Utilizando sitios de restricción únicos de endonucleasa en la región promotora, pueden modificarse diferentes regiones del promotor y UTR 5' para delecionar secuencias que tengan un efecto sobre la expresión de una MT en presencia o en ausencia de una MR de la presente invención. Por ejemplo, en otra realización, se realiza una delección en una secuencia que codifica la región de inicio (rin) de la transcripción de tal manera que la actividad intrínseca de un promotor inducible que está unido operativamente a una secuencia que codifica una MT, se modifica, por ejemplo, la actividad disminuye o aumenta. En otra realización, cadena abajo de la región de inicio (rin) de la transcripción, existe una secuencia unida operativamente que codifica la UT12 (región no traducida 5' del CMV, +1 a +112).

La MR se codifica por una secuencia de ácido nucleico que está unida operativamente a una secuencia promotora inducible (por ejemplo SEC ID N°: 1) que tiene 6X DBS de GAL-4 unidos operativamente a una secuencia de la caja TATA. La secuencia desde -33 a -22, que contiene la caja TATA desde la región Elb de Adenovirus de tipo 2 (restos 1665-1677 del número de registro NCBI J01917) es adecuada para su uso en dicha realización de la presente invención. En otra realización, la secuencia promotora comprende 6X DBS de GAL-4 unidas operativamente a una secuencia de la caja TATA de Elb Ad y una secuencia CMV que contiene la supuesta región iniciadora (rin) del promotor de CMV (Macias y col., Journ. of Virol. 70(6): 3628 (1996)), de tal manera que estas secuencias funcionales están unidas operativamente a un ácido nucleico que codifica una MT.

La MT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que está unida operativamente a copias múltiples de un DBS de GAL-4 que comprende una secuencia de 17 nucleótidos 5'-TGGAGTACTGTCCTCCG-3' o 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3' (por ejemplo, del DBS de GAL-4 consenso de la SEC ID N°: 49). En una realización, la MT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que está unida operativamente a 4 copias de un DBS de GAL-4 comprendiendo cada una la secuencia de 17 nucleótidos 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3' separadas por un espaciador de 10 nucleótidos que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-AGTTTAAAAG-3' como, por ejemplo, en SEC ID N°: 50. En otra realización, la MT está codificada por una secuencia de ácido nucleico que está unida operativamente a 6 copias de un DBS de GAL-4 distribuido en dos grupos con 3 copias cada una de un DBS de GAL-4 y en el que: 1) en cada grupo (que contiene 3 copias de un DBS de GAL-4) la segunda copia del DBS de GAL-4 comprende la secuencia de 17 nucleótidos 5'-TGGAGTACTGTCCTCCG-3' y la primera y tercera copia del DBS de GAL-4 comprenden la secuencia de 17 nucleótidos 5'-CGGAGTACTGTCCTCCG-3; 2) cada copia dentro del grupo de 3 copias está separada por dos nucleótidos 5'-AG-3'; y 3) entre los dos grupos de 3 copias existe una secuencia espaciadora más alargada 5'-AGTCGAGGGTCAAG-3' (por ejemplo, la secuencia de la SEC ID N°: 51 que comprende 6 copias de DBS de GAL-4 como se describe).

Cuando se desea la expresión en un tejido particular, el sistema de expresión regulado de la presente invención puede modificarse para comprender promotores específicos de tejido. Por ejemplo, si el tejido diana para la expresión de la MT es músculo, la secuencia de ácido nucleico que codifica una MT puede unirse operativamente a un promotor específico de músculo, por ejemplo, una secuencia promotora de actina. Los promotores específicos de tejido, (por ejemplo, promotores específicos de músculo) pueden aumentar la fidelidad de la expresión de la MT codificada. En algunas realizaciones, los promotores específicos de tejido pueden proporcionar la ventaja de una expresión reducida en células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos, impidiendo de esta manera respuestas inmunitarias para la MT expresada (por ejemplo, proteína o ácido nucleico).

El sistema de expresión regulada de la presente invención se modifica para imponer una demora entre la administración de un ácido nucleico que codifica una MT (por ejemplo, un vector) y la inducción de la expresión de MT, particularmente cuando existe una respuesta inflamatoria hacia la administración del ácido nucleico. En esta realización, la expresión de la MT puede retrasarse hasta que exista una reducción en la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, aumentando la duración del retraso (tiempo antes de inducir la expresión de la MT) por ejemplo, de 12 a 54 días, la frecuencia de producción de anticuerpos anti-MT puede disminuir. Adicionalmente, en algunas realizaciones es deseable prolongar el retraso entre la introducción de los ácidos nucleicos que codifican una MT, y la administración de una MA (por ejemplo, un modulador de MR), particularmente un modulador de receptor modificado, más particularmente un modulador de receptores de esteroides modificado, incluso más particularmente un modulador de RP o RG modificado, incluso más particularmente un análogo de ligando de RP o RG, e incluso aún más particularmente una antiprogestina modificada (por ejemplo, una MFP modificada) o una mesoprogestina modificada (por ejemplo, una asoprisnil modificada) que regula la expresión y/o actividad de la MT en las células de un sujeto (por ejemplo, cuando la MA activa una MR y la presencia de la MR

activada regula por tanto la expresión y/o actividad de la MT). En una realización, el periodo de retraso es de 12 días, preferentemente 20 días y más preferentemente 55 días o hasta que la respuesta inmunitaria haya disminuido.

El sistema de expresión regulado está modificado de tal manera que la especificidad, selectividad, sincronización exacta y/o nivel de la expresión y/o actividad de la MT se module en presencia de una MR. En una realización adicional, la MR tiene una rápida eliminación en un sujeto al que se administra una MR de la presente invención.

La MR es una proteína y se modifica de tal manera que se activa en presencia de un ligando específico u homólogo y, por lo tanto, la presencia de la MR activada regula la expresión y/o actividad de una MT. Adicionalmente, la especificidad y rigurosidad de activación de la MR puede optimizarse por mutación del DBD de GAL-4 de la MR para minimizar cualquier propensión a formar dímeros en ausencia de una MA. Más específicamente, para minimizar cualquier activación y/o formación de dímeros no específica de la MR (por ejemplo, en ausencia de una MA), la MR puede modificarse por mutación del dominio de GAL-4 delecionando o de otra manera mutando la parte C terminal del DBD de GAL-4 (por ejemplo, los 20 restos C terminales) y, por lo tanto, reduciendo la longitud de una estructura superenrollada que se supone que contribuye a la formación homodimérica de GAL-4.

El Dominio de Unión al ADN de GAL-4 ("DBD GAL-4") comprende una parte o fragmento de 1-93 aminoácidos del DBD N terminal de GAL-4 (en el que, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos 2-93 es la SEC ID N°: 37 y el aminoácido 1 es una metionina). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el DBD GAL-4 comprende los aminoácidos 2-93 del DBD N terminal de GAL-4 (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 38, o codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 37). En una realización, el DBD de GAL-4 comprende los aminoácidos 2-93 del DBD N terminal de GAL-4 y una secuencia peptídica N-terminal unida operativamente por ejemplo como en la SEC ID N°: 46 (o codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 45), en el que, por ejemplo, la secuencia peptídica N terminal está inmediatamente seguida por los aminoácidos 2-93 del DBD N terminal de GAL-4. En otras realizaciones, el DBD de GAL-4 comprende los aminoácidos 2-74 del dominio de unión al ADN N terminal de GAL-4 (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 48, o codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 47). En algunas realizaciones, un DBD de GAL-4 adecuado tiene una modificación en una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que da como resultado una mutación del DBD de GAL-4 de tal manera que conserva la capacidad de unirse a un sitio de unión de 17 oligómeros canónico, CGGAAGACTCTCCTCCG, pero tiene una capacidad reducida para formar una estructura terciaria helicoidal necesaria para la autodimerización. En algunas realizaciones, las mutaciones o deleciones se realizan en la región que abarca los aminoácidos 75 a 93 y/o 54 a 74 de la secuencia DBD de GAL-4. Por ejemplo, en una realización, se realiza una deleción de los aminoácidos 54 a 64 o 65 a 75 de la secuencia DBD de GAL-4, de tal manera que la autodimerización se minimiza a través de la región superenrollada de una MR que comprende el DBD de GAL-4 mutado.

La secuencia de ácido nucleico de la MR se modifica para codificar una proteína de fusión o quimérica que comprende uno o más dominios funcionales, por ejemplo, un dominio de unión al ADN (DBD), dominio de unión a ligando (LBD), y/o dominio regulador (DR) (por ejemplo, un dominio de activación). Los ejemplos de dominios funcionales adecuados para su uso en las proteínas de fusión o quiméricas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, el DBD de GAL-4, el LBD del receptor de progesterona humano (hPR) y el DA de p65 de NFκappaB.

Los ejemplos de dominios reguladores (DR) adecuados para su uso en una MR de la presente invención incluyen, pero sin limitación, NFκappaBp65, VP-16, TAF- 1, TAF-2, TAU-1, TAU-2, ORF-10, TEF-1 y cualquier otra secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que tenga una función reguladora (por ejemplo, que regule la expresión y/o actividad de la molécula de la presente invención) y, más particularmente, una función reguladora transcripcional (véase por ejemplo, Pham y col. (1992) Mol. Endocrinol. 6 (7):1043-50; Dahlman-Wright y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 1619-1623; Milhon y col. (1997) Mol. Endocrinol. 11 (12): 1795-805; Moriuchi y col. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(20): 9333-7; Hwang y col. (1993) EMBO J 12(6): 2337-48). En una realización, el DR preferido es un dominio de transactivación humano (por ejemplo p65 NFκappaB). En otra realización, la MR, particularmente un dominio funcional de la MR (por ejemplo un DR) está humanizado.

El LBD de una MR de la presente invención deriva de una secuencia de aminoácidos correlacionada con un LBD de tipo natural de un receptor en la familia de receptores de esteroides, por ejemplo, un receptor de progesterona (RP) y más particularmente, un receptor de progesterona humano (hPR). En otra realización, la MR es un receptor de esteroides y la secuencia de aminoácidos del LBD del receptor de esteroides (por ejemplo, una RP y más particularmente un hPR) está mutado para dar como resultado un LBD del receptor de esteroide mutado (por ejemplo, un LBD de hPR mutado) que se une selectivamente a una MA que es una antiprogestina en lugar de progestina. Por tanto, en esta realización, una MR que tiene un LBD de receptor de esteroide mutado (por ejemplo, un LBD hPR mutado) puede activarse selectivamente mediante una MA que es una antiprogestina, en lugar de una progestina de origen natural. En particular, en una realización, la antiprogestina se une a un RP natural, pero actúa como un antagonista.

La progestina se une a un RP de tipo natural y actúa como un agonista, y no se une a un RP truncado o mutado. En otra realización, un RP mutado retiene la capacidad de unirse a antiprogestinas, pero responde a ellas como agonistas. En una realización preferida, cuando la antiprogestina se une a un RP mutado que es una MR, la proteína RP mutada se activa y forma un dímero. En esta realización, el complejo dímero-antiprogestina después se une al

DBS de una secuencia promotora y, por lo tanto, induce la transcripción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, en la que la secuencia de ácido nucleico está unida operativamente al promotor.

En presencia de la MFP antiprogestina (RU486), la MR quimérica se une a un DBS de GAL-4 de 17 oligómeros unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una MT, y da como resultado una transactivación inducible por ligando eficaz de la expresión de MT. El LBD de la hormona esteroidea modificada de la MR también puede modificarse por delección de los aminoácidos carboxi terminales, preferentemente, de aproximadamente 1 a 120 aminoácidos carboxi terminales. El grado de delección deseado puede obtenerse utilizando técnicas biológicas moleculares convencionales para conseguir tanto la selectividad para el ligando deseado como una alta inducibilidad cuando se administra el ligando. En una realización, el LBD del receptor de hormonas esteroideas mutado está mutado por delección de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 aminoácidos carboxi terminales. En otra realización se delecionan 42 aminoácidos carboxi terminales. En otra realización más, que tiene tanto elevada selectividad como elevada inducibilidad, se delecionan 19 aminoácidos carboxi terminales.

La secuencia de ácido nucleico de una MR comprende una secuencia que codifica un DBD de GAL-4 truncado, un receptor de progesterona mutado que tiene una delección C terminal de 19 aminoácidos y un dominio de transactivación p65 (por ejemplo, SEC ID N°: 39). En otra realización, la secuencia de ácido nucleico de una MR comprende una secuencia que codifica un receptor quimérico que tiene un dominio de unión a ligando del receptor de progesterona mutado, un dominio de unión a ADN de GAL-4 truncado y un dominio transregulador VP16 o p65, en el que el dominio transregulador p65 es parte del dominio de activación de la proteína p65 humana; un componente del complejo NFkappaB. Sustituyendo VP16 con diversos dominios de activación derivados de seres humanos, por ejemplo, los restos 286-550 de la p65 humana, la potente inducibilidad del receptor quimérico puede conservarse al mismo tiempo que "se humaniza" la proteína o se reduce el potencial de una respuesta inmunitaria de proteína extraña debido al componente VP16 viral.

Un DBD de una MR de la presente invención no está limitado a un DBD GAL-4 modificado como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un DBD adecuado es uno que se ha modificado para eliminar secuencias que no son esenciales para el reconocimiento de sitios de unión pero puede suponerse que contribuye a la autodimerización en virtud de su estructura secundaria. Otros DBD que también pueden modificarse de esta manera y ser adecuados incluyen, por ejemplo, el DBD conocido de un miembro de la familia de receptores de esteroides (por ejemplo, receptor de glucocorticoide, receptor de progesterona, receptor del ácido retinoico, receptor tiroideo, receptor de andrógenos, receptor de ecdisona) y otras proteínas de unión al ADN celulares tales como la proteína de unión a Elemento de Respuesta a AMPc (CREB) o proteínas de unión a ADN de dedo de cinc, tales como SP1.

La familia de receptores esteroideos de las proteínas reguladoras de genes también es adecuada para la construcción de una MR de la presente invención. Los receptores esteroideos son factores de transcripción activados por ligandos cuyos ligandos pueden variar de esteroides a retinoides, ácidos grasos, vitaminas, hormonas tiroideas y otras pequeñas moléculas actualmente no identificadas. Estos compuestos se unen a receptores y bien regulan positivamente o bien regulan negativamente la expresión de los genes regulados por esteroides. Se describe que los compuestos se eliminan del organismo mediante mecanismos existentes y son normalmente no tóxicos. En la presente invención, un ligando de un receptor de esteroide puede ser cualquier compuesto o molécula que active el receptor de esteroide, por ejemplo, uniéndose a, o de otra manera interactuando con, el LBD del receptor de esteroide.

La expresión "receptor de hormona esteroide" como se usa en el presente documento se refiere a receptores de hormonas esteroideas en la superfamilia de receptores esteroideos. Ejemplos representativos de dicha familia de receptores de hormonas esteroideas incluyen, pero sin limitación, el estrógeno, progesterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógeno, hormona tiroidea, ácido retinoico, retinoide X, Vitamina D, COUP-TF, ecdisona, Nurr-1 y receptores huérfanos. Los receptores para hormonas en la familia de supergén de esteroides/tiroidea/retinoidea, por ejemplo, son factores de transcripción que se unen a secuencias diana en las regiones reguladoras de los genes sensibles a hormonas para potenciar o suprimir su transcripción. Estos receptores tiene similitudes evolutivamente conservadas en una serie de dominios estructurales individuales, incluyendo un dominio de unión al ligando (LBD), un dominio de unión a ADN (DBD), un dominio de dimerización, y uno o más dominios de transactivación.

Pueden generarse diversas mutaciones o cambios en las secuencias de aminoácidos de los diferentes dominios estructurales para formar una variante de receptor de esteroide o más específicamente un receptor de esteroide mutado. En una realización, el receptor de esteroide mutado es capaz de unirse preferentemente a un ligando no natural o no nativo en lugar de unirse al ligando del receptor de la hormona de tipo natural o de origen natural. En una realización, un receptor de hormona mutado se genera delecionando aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de un receptor de hormona de referencia (por ejemplo, un receptor de hormona de tipo natural o de origen natural) por ejemplo, una delección de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 aminoácidos desde el extremo carboxi terminal del receptor de la hormona de referencia. En otra realización, un receptor de progesterona mutado de la presente invención comprende una delección carboxi terminal de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 60 aminoácidos de un receptor de progesterona de referencia (por ejemplo, receptor de hormona de tipo natural o de origen natural). En otra realización, un receptor de progesterona mutado comprende una

deleción carboxi terminal de 19 aminoácidos de un receptor de progesterona de referencia (por ejemplo, un receptor de hormona de tipo natural o de origen natural). En una realización, la MR comprende un LBD de receptor de progesterona o una parte del mismo, que tiene una o más mutaciones dirigidas dentro del LBD o parte del mismo que comprende los aminoácidos 690-914 del receptor de progesterona humano (hPR). En algunas realizaciones, el

- 5 LBD del receptor de progesterona mutado o una parte del mismo comprende una mutación dirigida en la posición 719, como en pGT1003, pGT1004 y pGT1005; o una mutación dirigida en la posición 755, como en pGT1006, pGT1007, pGT 1008 y pGT1009; o dos mutaciones dirigidas en las posiciones 729 y 755, como en pGT1015, pGT1016, pGT1017 y pGT1025; o dos mutaciones dirigidas en las posiciones 726 y 755, como en pGT1020, pGT1021, pGT1022, pGT1023 y pGT1024.
- 10 Se describen ejemplos adicionales de receptores de hormonas esteroides modificados o mutados para la modificación y/o uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención, por ejemplo: (1) "Adenoviral Vector-Mediated Delivery of Modified Steroid Hormone Receptors and Related Products and Methods" Publicación de Patente Internacional N° WO 0031286 (PCTAJS99/26802); (2) "Modified Glucocorticoid Receptors, Glucocorticoid Receptor/Progesterone Receptor Hybrids" Publicación de Patente Internacional N° WO 9818925 (PCTAJS97/19607);
- 15 (3) "Modified Steroid Hormones for Gene Therapy and Methods for Their Use" Publicación de Patente Internacional N° WO 9640911 (PCT/US96/0432); (4) "Mutated Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy" Publicación de Patente Internacional N° WO 9323431 (PCTAJS93/0439); (5) "Progesterone Receptors Having C-Terminal Hormone Binding Domain Truncations", Patente de Estados Unidos N° 5.364.791; (6) "Modified Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy" Patente de Estados Unidos N° 5.874.534; y (7) "Modified Steroid Hormone Receptors, Methods for Their Use and Molecular Switch for Gene Therapy" Patente de Estados Unidos N° 5.935.934.

Adicionalmente, puede seleccionarse un LBD del receptor de hormonas esteroides mutadas basándose en la capacidad de un antagonista de un receptor de hormona esteroide de tipo natural para activar el receptor mutante incluso en presencia de un agonista para el receptor de tipo natural. Por ejemplo, en una realización, la progesterona es el ligando normal del receptor de progesterona y actúa como un fuerte agonista para el receptor. La antiprogestina, MFP (RU486) es un ligando no natural o no nativo para el receptor de progesterona. Se considera que la MFP es una "antiprogestina" porque, aunque es capaz de ejercer un efecto agonista sobre el receptor de progesterona de tipo natural, la MFP inhibe los efectos agonistas de la progesterona. Por tanto, la MFP puede considerarse como "antagonista" para el receptor de progesterona de tipo natural cuando esté en presencia del

25 agonista normal, es decir cuando tanto la MFP como la progesterona están juntas en presencia del receptor de progesterona de tipo natural. Sin embargo, en algunas realizaciones de la presente invención, el receptor de la hormona esteroidea de progesterona mutada no está activado por la progesterona (agonista para el receptor de tipo natural) sin embargo está activado en presencia de MFP ("antagonista" para el receptor de tipo natural). Además, en una realización, la progesterona no bloquea la activación del receptor de hormona esteroidea mutado por MFP. Por tanto, el receptor mutado puede caracterizarse como activado cuando se une a un antagonista (por ejemplo MFP) para el receptor de tipo natural incluso en presencia de un agonista (por ejemplo, progesterona) para el receptor de progesterona de tipo natural.

El receptor de esteroide mutado activa la transcripción de una MT deseada en presencia de un antagonista de un receptor de hormona esteroidea de tipo natural. En algunas realizaciones, el antagonista es un ligando de tipo no natural y no de origen natural que actúa como un antagonista de un receptor de esteroide de tipo natural (por ejemplo, un receptor de hormonas esteroides de tipo natural). En una realización, un antagonista de un receptor de hormona esteroidea de tipo natural es una molécula que interacciona con o se une al receptor de hormona esteroidea de tipo natural y bloquea la actividad de un agonista del receptor. En otra realización, un agonista de un receptor de hormona esteroidea de tipo natural es una molécula que interacciona con el receptor de hormona esteroidea de tipo natural para regular la expresión y/o actividad de una MT en las células de un sujeto. Los ejemplos de dichos agonistas incluyen, pero sin limitación, progesterona o progestina para el receptor de progesterona 10, en el que la progesterona se une a un receptor de progesterona de tipo natural para activar la transcripción de los genes regulados por progesterona.

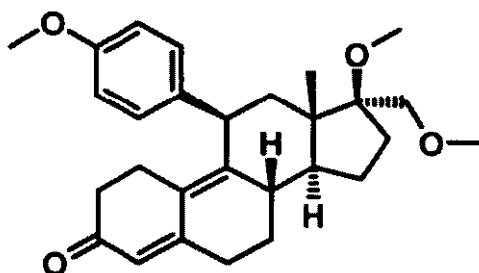
Los agonistas de receptores de progesterona adecuados son compuestos químicos que imitan la progesterona. Por ejemplo, Mifepristona (MFP), conocido de otra manera como RU486, es un ligando no natural que también se une al receptor de progesterona de tipo natural y compite con la progesterona para la unión. En realizaciones preferidas de la presente invención, la MA es un ligando de RP análogo que se une con baja afinidad o no se une, interacciona con o de otra manera tiene un efecto sobre el receptor de progesterona de tipo natural o cualquier otro receptor de esteroide endógeno y se une selectivamente y/o específicamente a una MR que tiene una LBD modificado que es selectiva o específica para la MA. En una realización, el análogo del ligando RP es, por ejemplo, BLX-913, BLX-833, BLX-899, BLX-593, BLX-599, BLX-952, BLX-610, BLX-117 o BLX-784. El receptor de progesterona (RP) puede modificarse, por ejemplo en el LBD del receptor de progesterona, de tal manera que solo se une a MFP y no a la progesterona. Por ejemplo, la mutación del LBD de receptor de progesterona puede ser tal que se una a MFP activando el receptor de progesterona. En una realización, el LBD del RP mutado, o más generalmente cualquier otro LBD del receptor de esteroide mutado, está fusionado con un DBD particular (por ejemplo, el DBD de GAL-4), de tal manera que la unión de MFP activa selectivamente la MR para transactivar la expresión y/o actividad de MT que está dirigida por un promotor reconocido por el DBD del RP. Por tanto, en algunas realizaciones, el receptor de esteroide mutado de la presente invención no se activa en presencia de agonistas para el receptor de esteroide de

tipo natural sino que en su lugar el receptor de esteroide mutado se activa en presencia de ligandos no naturales.

La expresión "ligandos no naturales" o "ligandos no nativos" se refiere a compuestos que son ligandos que no son de tipo natural o no son de origen natural que se unen al dominio de unión a ligando de un receptor. Los ejemplos de ligandos no naturales son los Moduladores de Receptores de Progesterona Selectivos (SPRM) o mesoprogesterinas (véase por ejemplo, Chwalisz y col. (2002) Ann NY Acad Sci 955: 373-388; Elger y col. (2000) Steroids 65(10-11): 713-723; Chwalisz y col. (2004) Semin Reprod Med 22 (2): 113-119; DeManno y col. (2003) 68(10-13): 1019-1032; Fuhrmann y col. (2000) J Med Chem 43(26): 5010-5016). Los ejemplos de SPRM o mesoprogesterinas se describen y se ilustran en la siguiente Tabla 2 (compuestos 1-16).

Tabla 2

- 10 1. nombre: 17β-Metoxi-17α-(metoximetil)-11β-metoxifenil-4,9-estra-dien-3-ona estructura:

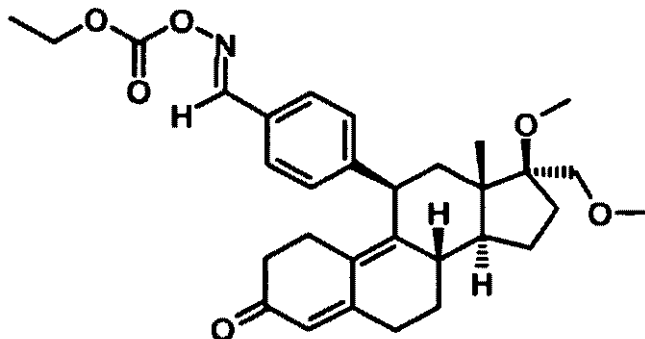


fórmula:  $C_{28}H_{36}O_4$

masa molecular: 436,60 g/mol

pf.: 184 - 186 °C (diclorometano)

- 15 2. nombre: 4-[17β-Metoxi-17α-(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]benzaldehído-1 (E)-[O-(etoxi)carbonil]oxima estructura:

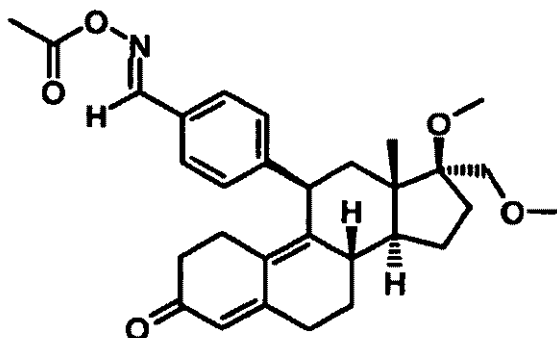


fórmula:  $C_{31}H_{39}NO_6$

masa molecular: 521,66 g/mol

- 20 pf.: 143-151 °C (descomposición del metanol)

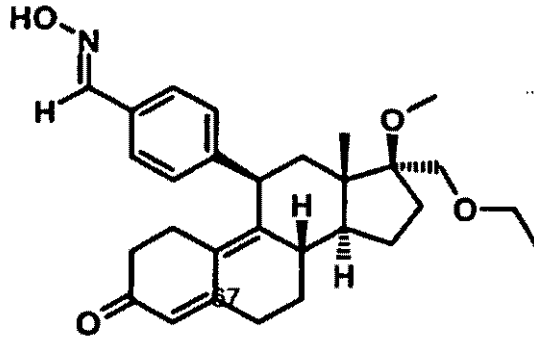
3. nombre: acetato de 4-[17β-Metoxi-17α-(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]benzaldehído-1 (E)-oxima estructura:





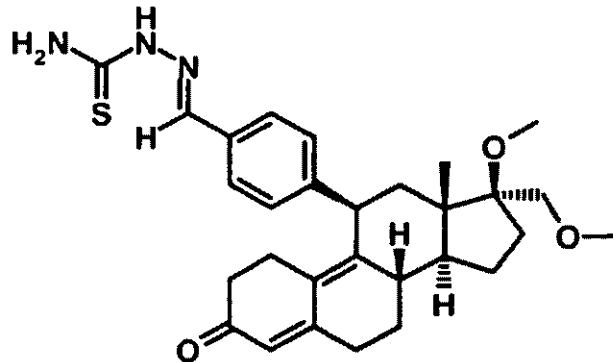
fórmula:  $C_{30}H_{37}NO_5$   
 masa molecular: 491,63 g/mol  
 pf.: 110-119 °C (acetato de etilo)

- 5 4. nombre: 4-[17 $\alpha$ -(Etoximetil)-17 $\beta$ -metoxi-3-oxoestra-4,9-dien-11 $\beta$ -il] benzaldehído-1 (E)-oxima  
 estructura:



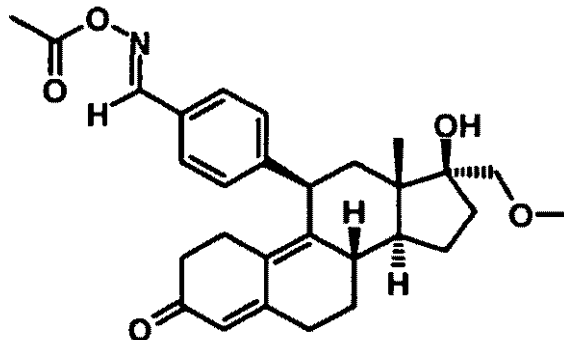
fórmula:  $C_{29}H_{37}NO_4$   
 masa molecular: 463,62 g/mol  
 pf.: 90- 95 °C (metil *terc* butil éter)  
 pureza por HPLC: 98,9 área % (264 nm)

- 10 5. nombre: 4-[17 $\beta$ -Metoxi-17 $\alpha$ -(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11 $\beta$ -il]benzaldehído-tiosemicarbazona  
 estructura:



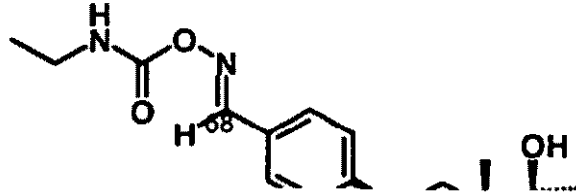
- 15 fórmula:  $C_{29}H_{37}N_3O_3S$   
 masa molecular: 507,69 g/mol  
 pf.: 217-236 °C (metanol)

6. nombre: acetato de 4-[17 $\beta$ -Hidroxi-17 $\alpha$ -(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11 $\beta$ -il]benzaldehído-1 (E)-oxima  
 estructura:



- 20 fórmula:  $C_{29}H_{35}NO_5$   
 masa molecular: 477,61  
 pf.: 112 °C (descomposición de la acetona),  $\alpha_D = +209^\circ$  ( $CHCl_3$ )

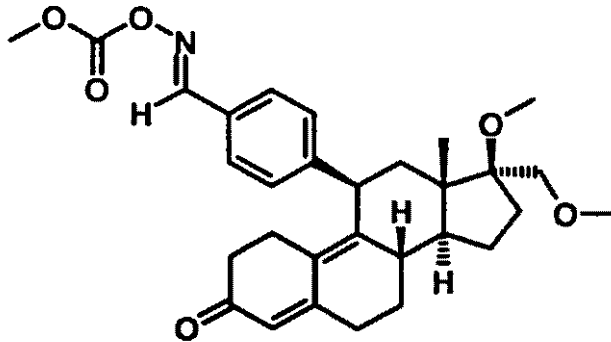
7. nombre: 4-[17β-Hidroxi-17α-(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]benzaldehído-1-(E)-[O-(etilamino) carbonil]oxima estructura:



5 fórmula:  $C_{30} H_{38} N_2 O_5$   
 masa molecular: 506,65 g/mol  
 pf.: 184-190 °C (cloruro de metileno / acetato de etilo)

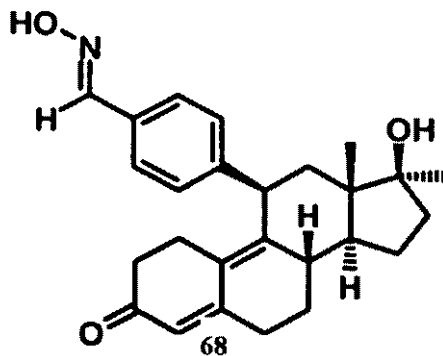
8. nombre: 4-[17β-Metoxi-17α-(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]benzaldehído-1-(E)-[O-(metoxi)carbonil]oxima (ZK280993) estructura:

10



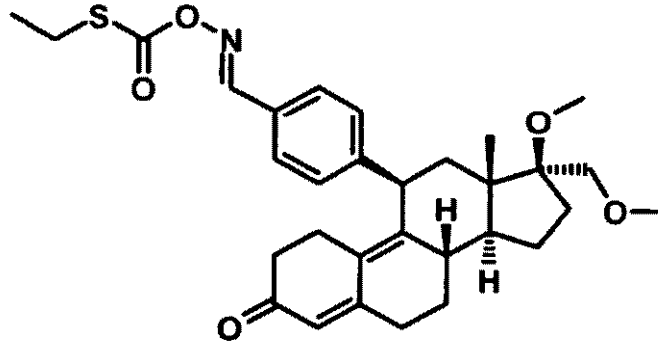
fórmula:  $C_{30} H_{37} N O_6$   
 masa molecular: 507,63 g/mol  
 pf.: 110 °C (descomposición de mtbe)

15 9. nombre: 4-(17β-Hidroxi 17α-metil-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il] benzaldehído-1(E)-oxima (ZK280999) estructura:



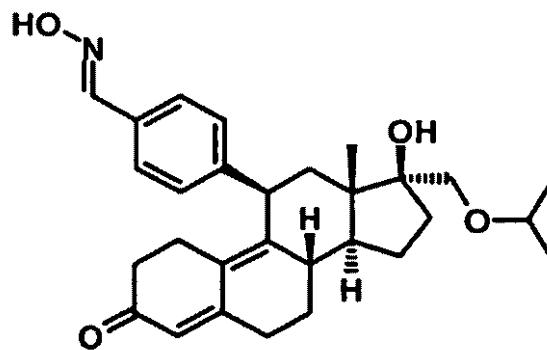
20 fórmula:  $C_{26} H_{31} N O_3$   
 masa molecular: 405,53 g/mol  
 pf.: 163-165 °C (etanol/agua)

10. nombre: 4-[17β-Metoxi-17α-(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]benzaldehído-1(E)-[O-(etiltio) carbonil]oxima (ZK190425)  
 estructura:



5 fórmula:  $C_{31}H_{39}NO_5S$   
 masa molecular: 537,72 g/mol  
 pf.: 148-155 °C descomposiciones (acetona/ n-hexano)

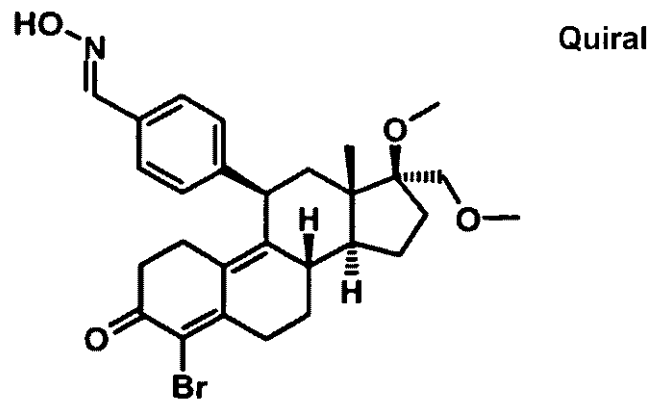
11. nombre: 4-[17β-Hidroxi-17α-(2-propoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]benzaldehído-1(E)-oxima (ZK281100)  
 estructura:



10

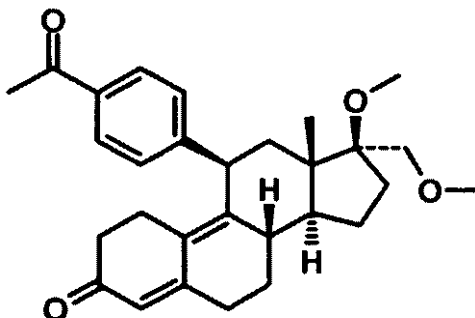
fórmula:  $C_{29}H_{37}NO_4$   
 masa molecular: 463,62 g/mol  
 pf.: 192-196 °C (descomposición del dietiléter)

12. nombre: 4-(4'-Brom-17β-metoxi17α-(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]benzaldehído-1(E)-oxima (ZK281117)  
 estructura:



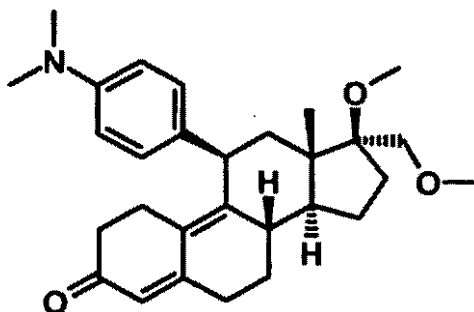
fórmula:  $C_{28}H_{34}BrNO_4$   
 masa molecular: 528,48 g/mol  
 pf.: 138-141 °C (dietiléter/n-hexano)

- 5 13. nombre: 4-[17β-Metoxi-17α-(metoximetil)-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il]acetofenon-11β-(4-Acetilfenil) 17β-metoxi-17α-(metoximetil)-4,9-estradien-3-ona (ZK139905)  
 estructura:



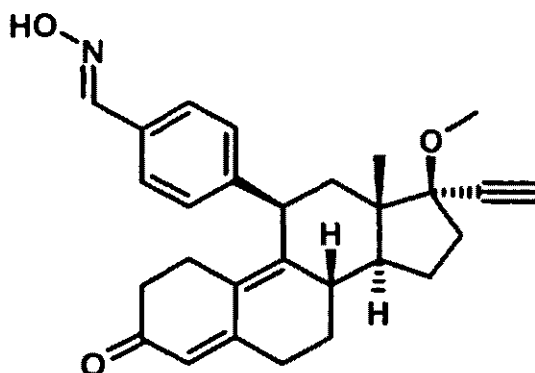
- 10 fórmula:  $C_{29}H_{36}O_4$   
 masa molecular: 448,61 g/mol  
 pf.: 133-137 °C (dietiléter/cloruro de metileno)

14. nombre: 11β-[4-(Dimetilamino)fenil]-17β-metoxi-17α-(metoximetil)-4,9-estradien-3-ona (ZK281317)  
 estructura:



- 15 fórmula:  $C_{29}H_{39}NO_3$   
 masa molecular: 449,64  
 espuma (hexano),  $\alpha_D = +184^\circ$  ( $CHCl_3$ )

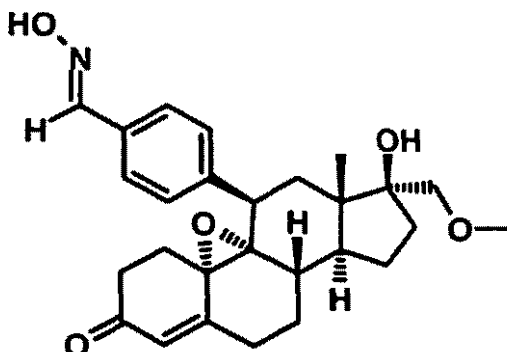
15. nombre: 4-[17α-Etínil-17β-metoxi-3-oxoestra-4,9-dien-11β-il] benzaldehído-1 (E)-oxima (ZK281527)  
 estructura:



- 20 fórmula:  $C_{28}H_{31}NO_3$   
 masa molecular: 429,56 g/mol  
 pf.: 149-157 °C (acetona)

16. nombre: 4-[9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxi-17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -(metoximetil)-3-oxoestr-4-en-11 $\beta$ -il] benzaldehído-(E)-oxima  
(ZK234965)

estructura:



- 5 fórmula: C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>5</sub>  
masa molecular: 451,57  
pf.: 110° C descomposición (acetona / metil *terc*-butil éter)

Adicionalmente, son ejemplos de ligandos no naturales y ligandos no nativos, antihormonas que pueden incluir lo siguiente: 11-(4-dimetilaminofenil)-17-hidroxi-17c-propinil-4, 9-estradien-3-ona (RU38486 o Mifepristona); 11-(4-dimetilaminofenil)-17 $\alpha$ -hidroxi-17-(3-hidroxipropil)-13-metil-4, 9-gonadien-3-ona (ZK98299 u Onapristona); 11-(4-acetilfenil)-17-hidroxi-17c-(1-propinil)- 4,9-estradien-3-ona (ZK112993); 11-(4-dimetilaminofenil)- 17-hidroxi-17(z-(3-hidroxi- 1 (Z)-propenil-estra-4,9-dien-3-ona (ZK98734); (7, 11, 17)-11-(4- dimetilaminofenil)-7-metil-4',5'- dihidrospiro [éster-4,9-dieno-17,2' (3'H)-furan]-3-ona (Org31806); (11, 14, 17c) -4', 5'-dihidro-11-(4-dimetilaminofenil)- [espiroestra- 4, 9-dieno-17,2'(3'H)-furan]-3-ona (Org31376); 5-c-pregnano-3,2-diona, Org 33628 (Kloosterboer y col. (1995) Ann N Y Acad Sci Jun 12; 761: 192-201), Org 33245 (Schoonen y col. (1998) J Steroid Biochem Mol Biol Feb; 64(3-4): 157- 70). Un ejemplo adicional de dichos ligandos son los ligandos de unión a receptores de progesterona no esteroideos, por ejemplo, que actúan como un inductor de una MR de la presente invención.

Los ligandos no naturales preferidos son análogos de ligandos de RP como se describe en el presente documento, por ejemplo, BLX-913 (ilustrado en la Figura 43), BLX-833, BLX-899, BLX-593, BLX-599 (ilustrado en la Figura 51) y BLX-952, BLX-610, BLX-117 o BLX-784 (ilustrado en la Figura 53). Estos y otros nuevos análogos de ligando RP funcionalmente selectivos para el sistema de expresión regulado de la presente invención pueden identificarse combinando datos de exploración de compuestos con modificación por ingeniería genética de proteínas para desarrollar un solo complejo MA-MR. Se ha descrito el uso de la especificidad y selectividad de la modificación por ingeniería genética en pares de ligando-receptor de hormonas nucleares que implica sistemas de expresión regulados basándose en el receptor de Estrógenos (Kinzel, O. y col. (2006) J. Med. Chem. 49: 5404-5407; Whelan, J. y col. (1996) J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 58: 3-12; Gallinari, P. y col. (2005) Chem. Biol. 12: 883-893; Shi, Y. y col. (2001) Chem. Biol. 8: 501-510; Chockalingam, K. y col. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 5691-5696; Tedesco, R. y col. (2001) Chem. Biol. 8: 277-287; Roscilli, G. y col. (2002) Mol. Ther. 6: 653-663), el receptor de Ecdisona (Kumar, M. B. (2004) J. Biol. Chem. 279: 27211-27218), el receptor X Retinoide (Doyle, D. F. y col. (2001) J. Am. Chem. Soc. 123: 11367-11371; Schwimmer, L. J. y col. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 14707-14712) y el Receptor Tiroideo (Hassan, A. Q. y col. (2006) J. Am. Chem. Soc. 128: 8868-8874).

Los compuestos esteroideos de tipo antiprogestina registrados, muchos de los cuales comparten similitud estructural significativa con la MFP, pueden identificarse y ensayarse usando ensayos de exploración con luciferasa basados en pBRES desarrollados por los autores de la presente invención. Los datos de relaciones estructura-actividad (SAR) derivados de esta exploración directa pueden usarse para identificar compuestos que no activan los sistemas de expresión pBRES, posiblemente debido a conflictos estéricos o electrónicos entre el compuesto y los aminoácidos que revisten el bolsillo de unión a ligando (LBP) dentro del LBD de la MR. Los compuestos así identificados se exploran adicionalmente en un ensayo secundario basado en células T47D para confirmar que los compuestos pBRES inactivos carecen de actividad anti-RP. Comenzando con estos compuestos candidatos inactivos puede desarrollarse un complejo MA-MR funcionalmente selectivo, es decir ortogonal con respecto a otras dianas fisiológicas, usando una estrategia de modificación por ingeniería genética de LBD guiada por modelado para reestablecer la activación de pBRES.

Dado que no están disponibles datos estructurales para la interacción entre compuestos similares a MFP y LBD derivado de hPR disponible, pueden desarrollarse modelos de homología para el complejo MFP-MR de LBD basándose en la estructura cristalina de rayos X de la RG formando complejo con MFP (Kauppi B. y col. (2003) J. Biol. Chem. 278: 22748-22754). Los compuestos inactivos identificados en la exploración directa se conectan dentro del modelo del LBD de la MR y los conflictos entre cada compuesto y los restos del LBP pueden identificarse. Después puede modelarse una serie de mutaciones dirigidas a aliviar los conflictos e instalarse en el LBP de la MR.

Como se describe en el presente documento, la capacidad de los compuestos candidatos para activar el sistema de expresión pBRES modificado por ingeniería genética puede medirse en el ensayo de luciferasa basado en pBRES. Aquellas mutaciones que mejoran la interacción entre compuestos previamente inactivos y el LBD de la MR modificado pueden conectarse en el modelo y usarse para proponer otras mutaciones diseñadas para ajustarse mejor al bolsillo de unión a ligando de una nueva MA. A través de iteraciones de la mutagénesis y ensayo en ciclos de ensayo basados en células, pueden identificarse los LBD de MR mutados que sean más activos, en respuesta a una MA de la presente invención, en lugar de la MR original. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la MR nueva mutada es al menos 10-50 veces, 50-100 veces, 100-200 veces, 200-300 veces, 300-400 veces, 400-500 veces, 500-600 veces, 600-700 veces o 700-800 veces más activa en respuesta a una MA de la presente invención, en comparación con la MR original o de referencia que no está mutada. En una realización, la nueva MR mutante es 30-50 veces más activa en respuesta a una MA de la presente invención. Estos estudios demuestran la aplicabilidad clínica del sistema de expresión pBRES.

Utilizando procedimientos convencionales para modificaciones de aminoácidos o de ácidos nucleicos (incluyendo, por ejemplo, deleciones, inserciones, mutaciones puntuales, fusiones), un dominio de proteína (por ejemplo, DA, LBD, DBD) o una secuencia de ácido nucleico funcional (por ejemplo la secuencia que codifica una proteína, ARN, promotor, sitio de corte y empalme, intrón, sitio de unión al ADN o sitio poli(A)) de una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT, MR, MA, MI o ácido nucleico que codifica una MT, MR, MA o MI) puede modificarse u optimizarse para dicha regulación, expresión y/o actividad. Adicionalmente, una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT, MR, MA, MI o ácido nucleico que codifica una MT, MR, MA o MI) puede modificarse de tal manera que la expresión y/o actividad de la molécula sea transitoria o constitutiva, y/o esté regulada por la presencia de una afección, enfermedad, biomarcador u otro molécula particular, o esté autorregulada. Más particularmente, la estructura primaria, secundaria o terciaria de una molécula de ácido nucleico o aminoácido, o compuesto químico, de la presente invención puede modificarse para conseguir una rigurosidad, especificidad particular o cantidad de unión, activación, inactivación o conformación (por ejemplo, para formar un homo- o heterodímero u otro multímero o unirse a un sitio o ligando afín o específico).

Por ejemplo, una parte transcrita de un casete de expresión de la presente invención puede modificarse para incluir elementos postranscripcionales (por ejemplo, una UTR, un sitio de corte y empalme, un intrón, y/o una señal poli(A)) que optimicen o mejoren la especificidad, el nivel y fidelidad de la expresión y/o actividad de una molécula expresada y codificada, unida operativamente (por ejemplo, una MT, una MR, una MA o una MI). Adicionalmente, la secuencia promotora de una secuencia unida operativamente que codifica una molécula de la presente invención puede modificarse de tal manera que la expresión de la molécula codificada sea, por ejemplo, transitoria o constitutiva, inducible o reprimible, y/o modularse o de otra manera regularse debido a la presencia de una condición o molécula específica.

Para optimizar la expresión y/o actividad de una molécula codificada (por ejemplo, MT, MR, MA o MI) pueden modificarse diversas secuencias funcionales de un casete de expresión de la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse secuencias intrónicas para optimizar la alta eficacia y corte y empalme preciso de transcritos de ARN a partir de dichas secuencias. Por lo tanto, el corte y empalme críptico puede minimizarse y la expresión de la molécula deseada puede maximizarse (por ejemplo, MT, MR, MA o MI) codificada por un ácido nucleico de la presente invención. Los ejemplos de intrones sintéticos adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las secuencias consenso para un sitio de corte y empalme en dirección 5', un sitio de corte y empalme en dirección 3' y/o un punto de ramificación. Se dice que el sitio de corte y empalme 5' se empareja con un ARNnp U1. Una secuencia consenso de sitio de corte y empalme en dirección 5' adecuada es una que está optimizada para minimizar la energía libre de la formación de hélice entre un ARN U1 y el sitio de corte y empalme en dirección 5' sintético, por ejemplo, una secuencia en el sitio de corte y empalme 5' que comprende 5'-CAGGUAAGU-3'. Adicionalmente, se dice que la secuencia de punto de ramificación (BP), excepto para un solo resto A protuberante, se empareja con un ARNnp U2. Por tanto, una secuencia de punto de ramificación puede optimizarse para minimizar la energía libre de la formación de hélice entre el ARN U2 y la secuencia. El BP se localiza normalmente en los nucleótidos 18-38 cadena arriba del sitio de corte y empalme en dirección 3'. En una realización, la secuencia BP del intrón sintético se localiza 24 nucleótidos cadena arriba a partir del sitio de corte y empalme en dirección 3' y es, por ejemplo, la secuencia BP que comprende 5' UACUAC 3'. Adicionalmente, el tramo de polipirimidina de la secuencia consenso para los sitios de corte y empalme en dirección 3' puede optimizarse para la función en el sitio de corte y empalme 3'. Por ejemplo, se ha descrito que al menos 5 restos uracilo consecutivos son óptimos para la función en el sitio de corte y empalme en dirección 3' y, por tanto, en algunas realizaciones, el tramo de polipirimidina de un intrón sintético de la presente invención tiene 7 restos de uracilo consecutivos.

De manera similar, la longitud de un intrón puede optimizarse. Por ejemplo, se sabe que los intrones de origen natural pueden tener una longitud de 90-200 nucleótidos. En una realización, la longitud de los exones internos resultantes es menor de 300 nucleótidos. En una realización, un intrón sintético es IVS8 (por ejemplo la SEC ID N°: 3) y comprende sitios de enzimas de restricción, BbsI y EarI (localizados dentro del intrón sintético) y PstI y NheI. La enzima de restricción BbsI puede usarse para escindir el ADN de manera precisa en el sitio de corte y empalme en dirección 5' y EarI puede usarse para escindir el ADN de manera precisa en el sitio de corte y empalme en dirección 3'. Adicionalmente, puede insertarse un intrón sintético en localizaciones múltiples de una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención se modifica para que comprenda intrones

múltiples.

Además del intrón sintético, IVS8 (por ejemplo, SEC ID N°: 3) se modifica un casete de expresión de la presente invención que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique una UTR 5' del CMV denominada UT12, un elemento de control de expresión (por ejemplo, SEC ID N°: 2). En otra realización, se modifica un casete de expresión de la presente invención para que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique una señal poli(A) del SV40 (por ejemplo, SEC ID N°: 8). En otra realización más, se modifica un casete de expresión de la presente invención para que comprenda una secuencia de ácido nucleico que codifique una señal poli(A) de la hormona del crecimiento humano ("hGH") (por ejemplo, SEC ID N°: 6). Estas y otras modificaciones descritas en el presente documento pueden emplearse para optimizar el nivel y fidelidad de expresión de una molécula codificada (por ejemplo, MT, MR, MA, MI) que se codifica por un ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, codificada por una secuencia de ácido nucleico de un casete de expresión o vector) como se describe en el presente documento.

La expresión "intrón" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia codificada en una secuencia de ADN que se transcribe en una molécula de ARN mediante una ARN polimerasa pero que se elimina mediante corte y empalme para formar el ARN mensajero maduro. Un "intrón sintético" se refiere a una secuencia que inicialmente no se replica a partir de una secuencia intrónica de origen natural y generalmente no tiene una secuencia de origen natural pero se eliminará de un transcrito de ARN durante el procesamiento postranscripcional normal. Dichos intrones sintéticos pueden diseñarse para que tengan diversas características diferentes, en particular dichos intrones pueden diseñarse para que tengan una resistencia del sitio de corte y empalme deseada y una longitud deseada. En una realización preferida de la presente invención, tanto el casete de expresión de cambio molecular como el casete de expresión génica terapéutico incluyen un intrón sintético. Los intrones sintéticos incluyen secuencias consenso para el sitio de corte y empalme en dirección 5', sitio de corte y empalme en dirección 3' y punto de ramificación. Cuando se incorporan en vectores eucariotas diseñados para expresar genes terapéuticos, el intrón sintético dirigirá el corte y empalme de transcritos de ARN de una manera muy eficaz y de una manera muy precisa, minimizando de esta manera el corte y empalme críptico y maximizando la producción del producto génico deseado.

Adicionalmente, utilizando procedimientos conocidos, puede modificarse una secuencia funcional que codifica un dominio de una proteína para optimizar la actividad de la proteína. Por ejemplo, usando modelado molecular, puede diseñarse un mutante de truncamiento de manera que exista un menor potencial de dimerización conservando al mismo tiempo la actividad de unión al ADN específica de secuencia de una proteína que tenga un DBD de GAL-4. Se dice que el DBD de GAL-4 se une como un dímero al DBS de GAL-4 de 17 oligómeros palindrómicos (CGGAAGACTCTCCTCCG) y se ha indicado que dicha unión dimerica da como resultado la activación de un promotor inducible que tiene el DBS de GAL-4. Por tanto, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que tiene un DBD de GAL-4 puede modificarse de tal manera que la estructura terciaria del DBD de GAL-4 se optimiza para reducir cualquier dimerización no regulada (por ejemplo, independiente de MA) o no deseada, dando como resultado la activación de un promotor inducible.

La estructura y función de las secuencias DBD de GAL-4 se conocen (véase, por ejemplo, PCT/US01/30305). Por ejemplo, la cisteína (C) puede estar implicada en la quelación del cinc; las estructuras superenrolladas que forman los elementos de dimerización comprenden los restos 54-74 y 86-93; los aminoácidos generalmente hidrófobos se describen como la primera y cuarta posiciones de cada secuencia repetida septeto; se describe que el resto Ser 47 y Arg 51 forman un enlace de hidrógeno entre las cadenas de proteína formando los dímeros; y se dice que los restos 8-40 forman el dominio de unión a Zn de la unidad de reconocimiento del ADN. Esta unidad de reconocimiento del ADN tiene dos dominios helicoidales alfa que forman una estructura globular compacta y en presencia de Zn da como resultado una estructura que se dice que es un agrupamiento iónico metálico binuclear en lugar de un dedo de cinc, es decir, la secuencia de aminoácidos rica en cisteína (CysXa-Xaa2-Cys14-Xaaa-CysZ1-Xaa6-CysZS-Xaa2-Cys31-Xaaa-Cys38) se une a dos iones Zn(II) (Pan y Coleman (1990) PNAS 87: 2077-81). El grupo Zn puede ser responsable para establecer contacto con el surco principal de los 3 pb en el extremo final del sitio de unión 17-met; y se ha indicado que una prolina en 26 (cis prolina) forma el bucle que une los dos dominios alfa helicoidales del dominio del grupo de cinc y también es crítica para esta función. Adicionalmente, se ha indicado que los restos 41-49 unen la unidad de reconocimiento del ADN y los elementos de dimerización, restos 54-74 y 86-93.

Una vez dimerizados, los restos 47-51 del dímero también pueden interactuar con fosfatos del ADN diana. Los restos 50-64 pueden estar implicados en una débil dimerización. Los dímeros consisten en un superenrollamiento corto que forma una hélice alfa anfipática y en el que las dos hélices alfa están empaquetadas en un superenrollamiento paralelo similar a una cremallera de leucina. Además de interacciones hidrófobas de tres pares de leucinas y un par de valinas encontradas dentro de los restos 54-74, existen dos pares de enlaces salinos Arg-Glu 20 y enlaces hidrógeno entre Arg 51 de un monómero con Ser 47 del otro monómero. Los restos 65-93 pueden formar un fuerte dominio de dimerización. La estructura de los restos 65-71 es una continuación de la estructura superenrollada para una repetición septeto. Los restos 72-78 contienen una prolina y por lo tanto modifican la hélice anfipática. Sin embargo, los restos 79-99 contienen tres secuencias septeto potencialmente alfa helicoidales más (Marmorstein y col (1992) Nature 356: 408-414). Adicionalmente, se ha indicado que la Kd para la unión de los restos 1-100 de GAL-4 es de 3 nM (Reece y Ptashne (1993) Science 261: 909-911).

A la vista de la estructura y función de las secuencias DBD de GAL-4 pueden realizarse diversas posibles modificaciones en las regiones del dominio GAL-4. En algunas realizaciones, las regiones GAL-4 se modifican para optimizar la eliminación o reducción de cualquier expresión y retención basal de la unión de ADN específica de secuencia. Más particularmente, en algunas realizaciones, la longitud de la región que contiene las secuencias superenrolladas de interacción del DBD de GAL-4 (por ejemplo los restos 54-74 y los restos 86-93) pueden acortarse por delección, por ejemplo, deleccionando la secuencia de aminoácidos 54-64, 65-74, 54-74 o 86-93. Además, los mutantes de GAL-4 con solo una región superenrollada pueden construirse deleccionando una de las regiones superenrolladas. Además, pueden insertarse secuencias mutantes o artificiales en el dominio GAL-4 usando sitios de restricción únicos situados, por ejemplo, en las uniones de cada una de las secuencias septeto alfa helicoidales. Por tanto, pueden producirse versiones modificadas del dominio GAL-4 que tengan secuencias septeto alfa helicoidales progresivamente reducidas.

La secuencia GAL-4 nativa se modifica para eliminar la metionina N terminal y se añaden aminoácidos adicionales en el extremo N terminal de la secuencia. En estas realizaciones, las modificaciones en los aminoácidos N terminales de la secuencia GAL-4 nativa no son importantes siempre que no afecten a la estructura terciaria de los restos 8-40 de dominio de unión a Zn. Además, en algunas realizaciones, la unión específica de una MA de pequeña molécula (por ejemplo, un análogo de ligando de RP, particularmente una progestina modificada, tal como una MFP modificada o una mesoprogestina modificada tal como un asoprisnil modificado), con un LBD hPR mutado de una proteína que tiene un DBD de GAL-4 (por ejemplo, una MR) desencadena un cambio conformacional en la proteína para iniciar la dimerización de la proteína. Adicionalmente, en algunas realizaciones, un casete de expresión de la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica los restos 2-93 de la secuencia DBD de GAL-4 de la SEC ID N°: 37. Adicionalmente, en una realización, la secuencia de reconocimiento del ADN del DBD de GAL-4 comprende los restos 9-40 de la secuencia DBD de GAL-4 de la SEC ID N°: 37.

En una realización de la presente invención, el dominio GAL-4 está truncado por delección de 19 aminoácidos en la parte C terminal del DBD GAL-4 y comprende los restos 75-93 de la secuencia DBD de GAL-4 de la SEC ID N°: 37. Una MR de la presente invención es una proteína quimérica que comprende un receptor de progesterona mutado que comprende los restos 2-74 de la secuencia DBD de GAL-4 de la SEC ID N°: 37 y un LBD del receptor de progesterona mutado que se activa específicamente en presencia de una MA. Adicionalmente, en ausencia de la MA existe escasa o ninguna activación de MR y se produce la inducción o activación de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a un promotor que tiene un DBS de GAL-4.

Como se ha mencionado, los ácidos nucleicos que codifican variantes de una molécula nativa (por ejemplo, proteína o ácido nucleico) también son adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, una variante de IFN- $\beta$  (por ejemplo, IFN- $\beta$  1 b) es adecuada para su uso como una MT en las composiciones y procedimientos de la presente invención, particularmente, para el tratamiento de EM. Preferentemente, la variante de IFN- $\beta$  es una variante de una IFN- $\beta$  nativa humana. Las variantes de IFN- $\beta$  nativas humanas, que pueden ser de origen natural (por ejemplo, variantes alélicas que se producen en el locus de IFN- $\beta$ ) o se pueden producir de forma recombinante o sintética, tienen secuencias de aminoácidos que son similares a, o sustancialmente similares a una secuencia de IFN- $\beta$  nativa madura. Los ácidos nucleicos que codifican un IFN- $\beta$  humano nativo (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13) son adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención, por ejemplo, IFN- $\beta$  1 a (por ejemplo, SEC ID N°: 14). Además, los ácidos nucleicos que codifican una variante de IFN- $\beta$  humano son adecuados para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención por ejemplo, IFN- $\beta$  1b (véase por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° de Serie 4.588.585, 4.737.462 y 4.959.314). Las variantes también incluyen ácidos nucleicos que codifican fragmentos o formas truncadas de una molécula nativa (por ejemplo proteína o ácido nucleico) que conserva una actividad biológica o terapéutica. Por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican estos fragmentos o formas truncadas biológicamente activos de una proteína nativa. Adicionalmente, en algunas realizaciones, la proteína expresada de la presente invención puede estar glucosilada o no glucosilada.

Adicionalmente, las variantes de proteínas o ácido nucleico adecuadas para su uso en las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden ser variantes de una proteína o ácido nucleico nativa o de tipo natural, respectivamente, de cualquier especie de mamífero incluyendo, pero sin limitación, avícola, canina, bovina, porcina, equina y humana. Ejemplos no limitantes de variantes de IFN- $\beta$  incluidas en la presente invención (por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico, por ejemplo Nagata y col. (1980) Nature 284: 316-320; Goeddel y col. (1980) Nature 287: 411-416; Yelverton y col. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 731-741; Streuli y col. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 2848-2852; documentos EP028033B1 y EP109748B1. Véase también, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.518.584; 4.569.908; 4.588.585; 4.738.844; 4.753.795; 4.769.233; 4.793.995; 4.914.033; 4.959.314; 5.545.723; y 5.814.485. Estas citas también proporcionan una orientación con respecto a restos y regiones de la proteína IFN- $\beta$  que pueden modificarse sin perder la actividad biológica.

Pueden introducirse cambios o modificaciones de proteínas y ácidos nucleicos expresados (por ejemplo, ARN) de la presente invención por mutación en las secuencias de nucleótidos que las codifican, conduciendo por lo tanto a cambios en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de proteína de ácido nucleico expresada sin modificar la actividad biológica o terapéutica de la molécula expresada. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifique una proteína variante que tenga una secuencia que difiera de la secuencia de aminoácidos para una



referencia o proteína de partida puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos correspondiente (para variantes de IFN- $\beta$ , véase por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.588.585, 4.959.314; 4.737.462; L. Lin (1998) Dev. Biol. Stand. 96: 97-104), de tal manera que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en la secuencia que codifica una proteína de referencia o proteína de partida y por lo tanto da como resultado una proteína variante cuando se expresa la proteína codificante. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones por técnicas convencionales modificando secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, tal como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR.

Adicionalmente, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína pueden modificarse para codificar sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos de aminoácidos supuestos preferentemente no esenciales. Como se usa en el presente documento, un aminoácido "no esencial" es un resto que puede modificarse a partir de una secuencia de referencia de una proteína sin modificar su actividad biológica o terapéutica, mientras que un resto de aminoácido "esencial" es necesario para dicha actividad. Como se usa en el presente documento, una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han identificado en la técnica. Estas familias incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). En realizaciones preferidas, dichas sustituciones no se realizan en restos de aminoácidos conservados o en restos de aminoácidos que residen dentro de un motivo conservado.

Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos de una molécula variante pueden realizarse introduciendo mutaciones al azar a lo largo o en una parte de la secuencia codificante de una molécula de referencia, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse para determinar la actividad biológica o terapéutica. Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de manera recombinantes, y puede determinarse la actividad de la proteína usando técnicas de ensayo convencionales descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. En realizaciones preferidas, las variantes de proteína biológica o terapéuticamente activas tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80 %, más preferentemente aproximadamente de 90 % a aproximadamente 95 % o más, y más preferentemente de aproximadamente 96 % a aproximadamente 99 % con la secuencia de aminoácidos de una proteína de referencia, que sirve como base para comparar o como referencia. Como se usa en el presente documento "identidad de secuencia" se trata de los mismos restos de aminoácidos que los encontrados dentro de una proteína variante y una molécula de proteína que sirve como una referencia cuando un segmento especificado, contiguo de la secuencia de aminoácidos de la variante se alinea y se compara con la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia.

Para un alineamiento óptimo de las dos secuencias para los fines de la determinación de identidad de secuencia, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos de la variante puede tener restos de aminoácidos adicionales o restos de aminoácidos delecionados con respecto a la secuencia de aminoácidos de la molécula de referencia. Este segmento contiguo usado para la comparación con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia comprenderá al menos 20 restos de aminoácidos contiguos. Pueden realizarse correcciones para aumentar la identidad de secuencia asociada con la inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos de la variante asignando penalizaciones de hueco. En la técnica se conocen bien procedimientos de alineamiento de secuencias.

Por ejemplo, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualesquiera puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es, por ejemplo el algoritmo de Myers y Miller (1988) Comput. Appl. Biosci. 4: 11-7. Dicho algoritmo se utiliza en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete informático de alineamiento GCG. Puede usarse una tabla de restos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12, y una penalización de hueco de 4 con el programa ALIGN cuando se comparan secuencias de aminoácidos. Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático para su uso en la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410. Pueden realizarse investigaciones de secuencias de aminoácidos BLAST con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3, para obtener secuencias de aminoácidos similares a las de la proteína de interés.

Para obtener alineamiento con huecos para los fines de comparación, puede utilizarse el programa BLAST con huecos como se describe en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda integrada que detecte relaciones distantes entre moléculas (véase por ejemplo, Altschul y col. (1997) citado anteriormente). Cuando se utilizan los programas BLAST, BLAST con huecos o PSI-BLAST, pueden usarse parámetros por defecto (véase por ejemplo, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Véase también el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en Atlas of Protein Sequence and Structure 5:Supl. 3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.) y los programas en el Paquete de Análisis de Secuencia

Wisconsin, Versión 8 (disponibles en Genetics Computer Group, Madison, Wis.), por ejemplo, el programa GAP, en el que se utilizan parámetros por defecto de los programas.

5 Cuando se considera el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, algunas posiciones de los restos de aminoácidos puede diferenciarse como resultado de sustituciones de aminoácidos conservativas, que no afectan a las propiedades de la proteína. En estos casos, el porcentaje de identidad de secuencia puede ajustarse hacia arriba teniendo en cuenta la similitud en cuanto a los aminoácidos conservativamente sustituidos. Dichos ajustes son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Myers y Miller (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4: 11-17).

10 Adicionalmente, en realizaciones en las que la MR, MA o MI es una proteína, la proteína puede estar unida covalentemente con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o albúmina. Estas moléculas híbridas covalentes pueden tener determinadas propiedades deseables tales como una semivida en suero ampliada después de la administración a un sujeto. Los procedimientos para crear aductos PEG-IFN implican modificación química de monometoxipolietilenglicol para crear un compuesto activado que reaccionará con una proteína de la presente invención. Se describen procedimientos para preparar y usar proteína unidas a PEG, por ejemplo, en Delgado y col. (1992) *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 9: 249-304 (y como se describe en el presente documento en Antecedentes). Los procedimientos para crear proteínas de fusión con albúmina implican la fusión de las secuencias codificantes para la proteína de interés y la albúmina y se describen por ejemplo en la Patente de Estados Unidos N° 5.876.969.

20 Las variantes de proteína o ácido nucleico biológica o terapéuticamente activas incluidas en la presente invención conservan preferentemente o tienen una actividad biológica o terapéutica. En algunas realizaciones, la variante conserva al menos aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de la actividad biológica o terapéutica de la molécula de referencia (por ejemplo, proteína o ácido nucleico). También se incluyen variantes cuya actividad aumenta en comparación con la actividad de la molécula de referencia (por ejemplo, proteína o ácido nucleico). La actividad biológica o terapéutica de las variantes puede medirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (véase por ejemplo, ensayos descritos en Fellous y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3082-3086; Czerniecki y col. (1984) *J. Virol.* 49(2): 490-496; Mark y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5662-5666; Branca y col. (1981) *Nature* 277: 221-223; Williams y col. (1979) *Nature* 282: 582-586; Herberman y col. (1979) *Nature* 277: 221-223; Anderson y col. (1982) *J. Biol. Chem.* 257(19): 11301-11304).

35 Generalmente, para la clonación, ensayo y otros usos descritos en el presente documento, el ácido nucleico, proteína y composiciones químicas de la presente invención pueden producirse o sintetizarse usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden producirse cultivando una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique una proteína o ácido nucleico de la presente invención. La célula huésped es una que pueda transcribir la secuencia de nucleótidos y producir la proteína o ácido nucleico deseados y puede ser procariota (véase por ejemplo, *E. coli*) o eucariota (por ejemplo, una célula de levadura, de insecto o de mamífero). Los ejemplos de la producción recombinante de IFN- $\beta$ , incluyendo vectores de expresión adecuados, se proporcionan, por ejemplo, en Mantei y col. (1982) *Nature* 297: 128; Ohno y col. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10: 967; Smith y col. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156, y en las Patentes de Estados Unidos N° 4.462.940, 5.702.699 y 5.814.485; Patente de Estados Unidos N° 5.795.779).

45 Adicionalmente, se han clonado genes usando tecnología de ADN recombinante ("ADNr") y puede producirse y ensayarse, por ejemplo, en células animales o vegetales o en animales transgénicos (véase por ejemplo, Nagola y col. (1980) *Nature* 284: 316; Goeddel y col. (1980) *Nature* 287: 411; Yelverton y col. (1981) *Nuc. Acid Res.* 9: 731; Streuli y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 2848). También pueden producirse proteínas con tecnología de ARNr, por ejemplo, extrayendo ARN mensajero 12S rico en poli A a partir de células humanas inducidas, sintetizando ADNc bicatenario usando como molde el ARNm, introduciendo el ADNc en un vector de clonación apropiado, transformando microorganismos adecuados con el vector, recogiendo los microorganismos y extrayendo de los mismos la proteína (véase por ejemplo, las Solicitudes de Patente Europea N° 28033 (publicada el 6 de mayo de 1981); 32134 (publicada el 15 de julio de 1981); y 34307 (publicada el 26 de agosto de 1981)).

50 Además, pueden sintetizarse proteínas químicamente y ensayarse, mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas por los expertos en la técnica de péptidos (véase por ejemplo, Li y col. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2216-2220, Steward y Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.), y Baraney y Merrifield (1980) *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, ed. Gross and Meinhofer, Vol. 2 (Academic Press, N. Y., 1980), páginas 3-254, *Discussing Solid-Phase Peptide Synthesis Techniques*; y Bodansky (1984) *Principles of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Berlin) y Gross y Meinhofer, eds. (1980), *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1 (Academic Press, Nueva York, analizan síntesis de solución clásica). Una proteína de la presente invención también puede prepararse químicamente, por ejemplo, mediante el procedimiento de síntesis peptídica múltiple simultánea. Véase, por ejemplo Houghten (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5131-5135; y la Patente de Estados Unidos N° 4.631.211.

Adicionalmente, un experto en la materia sabrá cómo ensayar las composiciones de la presente invención para el tratamiento de enfermedades usando modelos animales apropiados y aceptados y procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se ha descrito que pueden usarse sistemas de suministro de genes para suministrar citocinas en diversos modelos de enfermedades autoinmunitarias animales, por ejemplo, incluyendo la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), artritis, lupus, y modelos de diabetes NOD (véase, por ejemplo G. C. Tsokos y G. T. Nepom (2000) Clin. Invest. 106: 181-83; G. J. Prud'homme (2000) J. Gene Med. 2: 222-32). La EAE es un modelo de inflamación del sistema nervioso central que se presenta después de la inmunización con determinados auto-antígenos del SNC, por ejemplo, proteolípidos derivados del cerebro o proteína básica de mielina. Su evolución y manifestaciones clínicas son similares a las de la esclerosis múltiple (EM) en seres humanos y ha comenzado a ser un modelo aceptado para el estudio de la EM. Ha habido diversos informes que describen el ensayo de los IFN de Tipo I, suministrados como una proteína (15-20) y por un vector (véase por ejemplo, K. Triantaphyllopoulos y col. (1998) Gene Therapy 5: 253-63; J. L. Croxford y col. (1998) J. Immunol. 160: 5181-87), en modelos de EAE murino y de rata. Yu y col. han demostrado que ratones a los que se había administrado la proteína mIFN- $\beta$ , en el momento de inducción de la enfermedad EAE, presentan un retraso de la progresión con respecto a la discapacidad (como se mide según la puntuación clínica), retraso de la aparición de reincidencia y una disminución en la frecuencia de agravamiento en comparación con ratones normales (véase por ejemplo, M. Yu y col. (1996) J. Immunol. 64: 91-100). Este resultado se parece mucho a los resultados en seres humanos con el tratamiento con IFN- $\beta$ . Triantaphyllopoulos y col. utilizaron vectores basados en plásmido en una estrategia basada en terapia génica para administrar IFN- $\beta$  al SNC bajo el control de un promotor específico neuronal (véase por ejemplo, K. Triantaphyllopoulos y col. (1998) Gene Therapy 5: 253-63). Estos vectores se inyectaron intracranalmente en ratones durante la fase efectora de la EAE y redujeron o impidieron los síntomas clínicos de la enfermedad. Los resultados de los estudios realizados hasta ahora utilizando IFN- $\beta$  en el modelo EAE murino demuestran que IFN es una terapia eficaz para retrasar la aparición y revertir las manifestaciones de la enfermedad en el modelo EAE. Se ha demostrado que los procedimientos de terapia génica para administrar IFN- $\beta$  en este modelo (administración local intracranial) son eficaces.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

Como se describe en los siguientes Ejemplos, se construyeron vectores de expresión de IFN- $\beta$  humano (hIFN- $\beta$ ) e IFN- $\beta$  murino (mIFN- $\beta$ ), se desarrollaron ensayos para medir directamente el IFN- $\beta$  en suero, y se identificaron biomarcadores que se correlacionan con la expresión de IFN- $\beta$  *in vivo*. Adicionalmente, se realizaron estudios farmacocinéticos en ratones normales comparando la administración basada en genes de IFN- $\beta$  con una administración de proteína de embolada y se demostró un perfil farmacocinético superior usando inyección intramuscular de ADN plasmídico no viral o un vector viral adenoasociado (AAV) que codifica IFN- $\beta$ . Además, se observó expresión estable, prolongada de IFN- $\beta$  durante casi 6 meses con un vector AAV-1 que expresaba hIFN- $\beta$ . Adicionalmente, se demostró que una sola inyección intramuscular del ADN plasmídico que codifica mIFN- $\beta$  era eficaz en un modelo murino de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), e igualmente tan eficaz como una inyección un día sí y otro no de la proteína mIFN- $\beta$ . Como se describe a continuación, se construyeron ejemplos de sistemas de expresión regulados de la presente invención y se ensayaron. Por ejemplo, la expresión regulada de IFN- $\beta$  se demostró en ratones normales usando un sistema de expresión regulado de la presente invención, en el que una MT y una MR estaban incluidas en un solo vector plasmídico.

Los datos de los estudios descritos en estos ejemplos demuestran el potencial del sistema de expresión regulado de la presente invención para administrar una MT codificada por ácido nucleico para el tratamiento de una enfermedad. En particular, estos ejemplos demuestran la posibilidad de usar sistemas de expresión regulados de la presente invención para administrar un ácido nucleico que codifica IFN- $\beta$  (por ejemplo, IFN- $\beta$  1a) para la expresión regulada prolongada de la proteína para el tratamiento de EM. En una realización, el vector administrado es un solo vector plasmídico que comprende un primer y un segundo casete de expresión que codifica una MT (por ejemplo, IFN- $\beta$ ) y una MR, respectivamente, que proporciona expresión persistente (por ejemplo mayor de 3 meses) y renovable mediante administración oral de una MA, por ejemplo, un inductor de pequeña molécula (por ejemplo, MFP) y, posteriormente, el vector es capaz de repetir la administración mediante inyección intramuscular.

### 50 EJEMPLO 1: Construcción de vectores para su uso en terapia génica de IFN- $\beta$ o GMCSF

**A. Vectores Plasmídicos:** El gen IFN- $\beta$  murino (mIFN- $\beta$ ) del vector de expresión bacteriano pbSER189 se amplificó por PCR, con inmunoglobulina kappa (IgK) (para la purificación de la proteína) o una secuencia de señal mIFN- $\beta$  (para terapia génica) añadida en el cebador en dirección 5'. Los productos de PCR se insertaron cadena abajo del promotor de citomegalovirus (CMV) y los vectores de expresión pCEP4/WPRE, para generar pGER90 (Figura 2A) para la expresión y purificación de la proteína recombinante y pgWiz, para generar pGER101 (Figura 2B) para la terapia génica.

El gen IFN- $\beta$  humano del vector de expresión bacteriano pbSER178 se amplificó por PCR mediante el mismo procedimiento que el del gen mIFN- $\beta$  (excepto con la secuencia señal hIFN para el vector de terapia génica) y se insertó en pCEP4/WPRE para generar pGER123 (Figura 2C) para la expresión y purificación de la proteína

recombinante, y pgWiz para generar pGER125 (Figura 2D) para la terapia génica.

La construcción de vectores plasmídicos se describe completamente en la sección de Procedimientos y Materiales, subsección F.

**B. Vectores AAV-1:** Se construyó un plásmido lanzadera AAV-1-hIFN- $\beta$  que codificaba hIFN- $\beta$  insertando el fragmento como HincII/NotI de pGWIZ/hIFN- $\beta$  que codifica hIFN- $\beta$  en el sitio AgeI-SalI protuberante del vector AAV-1, pTREGFP. El plásmido lanzadera resultante se denominó pGT62 (SEC ID N°: 44) y se usó para producir el virus AAV-1 que codifica hIFN- $\beta$ . Se prepararon dos lotes del virus AAV-1 como se describe en el presente documento usando procedimientos convencionales y usando los estudios farmacocinéticos (Figura 4). Los niveles de expresión de hIFN- $\beta$  en estos dos lotes virales se validaron por ELISA.

Además, los plásmidos lanzadera AAV-1-GM-CSF pGT714 y pGT713 (Figura 30B), que codifican mGMCSF o hGMCSF se construyeron insertando un fragmento que codifica mGMCSF o hGMCSF en el vector pGENE/V5HisA (Invitrogen). Los vectores resultantes se denominaron pGT723-GENE/hGMCSF y pGT724-GENE/mGMCSF. Después, un fragmento que codificaba mGM-CSF se escindió de pGT724-GENE/mGMCSF digiriendo el vector con KpnI-XbaI. De manera similar se escindió un fragmento que codificaba hGM-CSF de pGT723-GENE/hGMCSF digiriendo el vector con KpnI-XbaI. El vector pZac2.1 se digirió con KpnI-XbaI y se trató con fosfatasa intestinal de ternero (CIP) y después el fragmento escindido que codificaba bien mGMCSF o hGMCSF se insertó en pZac2.1 en el sitio KpnI-XbaI. Los plásmidos lanzadera resultantes se denominaron pGT713 (pZac2.1-CMV-hGMCSF) y pGT714 (pZac2.1-CMV-mGM-CSF) (Figura 30B).

La construcción de vectores de la presente invención se describe en su totalidad en el apartado de Procedimientos y Materiales, subapartado F.

#### **EJEMPLO 2: Estudios farmacocinéticos en el suministro del gen IFN- $\beta$**

**A. Estudios Farmacocinéticos con el IFN- $\beta$  Humano:** Se realizaron estudios farmacocinéticos en ratones normales para comparar la administración de la proteína en embolada frente a aquella basada en genes del IFN- $\beta$  humano (hIFN- $\beta$ ).

**1) Estudio Farmacocinético de la Proteína IFN- $\beta$ 1a Humana:** Se realizó un estudio farmacocinético en ratones C57/B16 usando inyección en embolada de hIFN- $\beta$ 1a recombinante suministrada mediante inyección intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.) y usando un ELISA disponible en el mercado para detectar los niveles de suero de hIFN- $\beta$ . La Figura 3 muestra el perfil farmacocinético de la proteína hIFN- $\beta$ 1a en suero de ratones después de una sola inyección i.m. o i.v. de 25 ng (1  $\mu$ g/kg) o 250 ng (10  $\mu$ g/kg) de la proteína hIFN- $\beta$ 1a. Después de la inyección i.v., se detectó hIFN- $\beta$ 1a en suero de una manera dependiente de la dosis en el primer momento (30 minutos), y se eliminó rápidamente de tal manera que los niveles estaban cerca del límite de detección (LOD) del ensayo (LOD = 12,5 pg/ml) a las 6 horas. Después de inyección i.m. de la proteína hIFN- $\beta$ 1a recombinante, el nivel en suero de hIFN- $\beta$ 1a alcanzó un nivel máximo a las 2 horas después de la inyección y después disminuyó aproximadamente 10 veces en 6 horas. La cantidad de hIFN- $\beta$ 1a restante en suero a las 6 horas fue mayor con la inyección i.m. en comparación con la inyección i.v. Con las dos inyecciones i.v. e i.m., se observó una diferencia de 10 veces en el nivel en suero de hIFN- $\beta$ 1a entre la dosis alta y baja. La cinética altamente transitoria presentada después de la inyección en embolada del hIFN- $\beta$ 1a recombinante es muy similar a los resultados previamente descritos en seres humanos y otras especies animales (Buchwalder, P-A y col. (2000) J Interferon Cytokine Res 20: 57-66; Pepinsky, RB y col. (2001) J Pharm Exp Ther 297: 1059-55).

**2) Estudio Farmacocinético de Suministro Basado en Genes de AAV-1-CMV hIFN- $\beta$ 1a:** Se construyó un vector AAV-1 que expresaba de manera constitutiva el IFN- $\beta$  humano (AAV-1-CMV hIFN- $\beta$ 1a) y se administró mediante inyección i.m. a tres dosis (0,5  $\times 10^{10}$ , 1,0  $\times 10^{10}$ , o 5,0  $\times 10^{10}$  partículas virales) en ratones C57B1/6. En la Figura 4 se observan los resultados. La expresión de IFN- $\beta$ 1a humano en el suero de ratones fue más baja el día 2 pero aumentó rápidamente hasta el día 10 tiempo en el cual los niveles de suero en los tres grupos de dosis alcanzaron un nivel o aumentaron gradualmente. Se observó una respuesta a la dosis clara con cantidades en aumento del vector AAV-1-CMV hIFN- $\beta$ 1a administrado. A los dos niveles más altos de dosis estables de hIFN- $\beta$ 1a, se detectó expresión en el suero 171 días después de la inyección. A diferencia del estudio usando inyección i.m. en embolada de la proteína hIFN- $\beta$ 1a recombinante, este estudio usando suministro basado en genes de un vector AAV-1 que codifica hIFN- $\beta$ 1a, demuestra una expresión prolongada de hIFN- $\beta$ 1a en suero después de una sola inyección del vector.

#### **EJEMPLO 3: Identificación y Uso de Biomarcadores de IFN- $\beta$ para Terapia Génica**

**A. Desarrollo de Biomarcadores de mIFN- $\beta$ :** Para una mayor sensibilidad en cuanto a la detección de la actividad de IFN- $\beta$  murino (mIFN- $\beta$ ) *in vivo*, se identificaron biomarcadores para la actividad de mIFN- $\beta$  en ratones después de inyección de la proteína mIFN- $\beta$  o vectores de terapia génica que codifican mIFN- $\beta$ . Para seguir la actividad de IFN- $\beta$  humano pueden usarse biomarcadores en muestras clínicas de pacientes tratados con Betaseron (IFN- $\beta$  1b) (véase por ejemplo, Arnason, BG (1996) Clin Immunol Immunopathol 81: 1-11; Deisenhammer, F y col. (2000) Neurology

54: 2055-60; Knobler, RL y col. (1993) J Interferon Res 13: 333-40.; Kracke, A y col. (2000) Neurology 541: 193-9). Uno de los biomarcadores primarios usados en estudios clínicos de IFN- $\beta$  es MxA (véase por ejemplo, Kracke, A y col. (2000) Neurology 541: 193-9; Bertoloto, A y col. (2001) J Imm Meth 256: 141-152) dado que está específicamente inducido por los IFN de tipo I (véase por ejemplo, von Wussow, P y col (1990) J Imm 20: 2015-19).  
 5 En este estudio, la expresión del homólogo de ratón MxA, Mx1, (véase por ejemplo, Hug, H y col. Mol Cell Biol 8: 3065-79; Pavlovic, J (1993) Ciba Found Symp 176: 233-43) aislado de monocitos de sangre periférica murina (CMSP) se usó para detectar la presencia de mIFN- $\beta$  biológicamente activo.

Se desarrolló un ensayo de PCR/RT-PCR cuantitativo para cuantificar los niveles del ARNm de Mx1 en los CMSP murinos. Específicamente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ratones tratados con proteína mIFN- $\beta$  o después de suministro basado en genes del gen de mIFN- $\beta$ . Las muestras de sangre obtenidas de los ratones tratados se centrifugaron en un cojín ficoll durante 25 minutos a 2.000 rpm. Las CMSP purificadas se sedimentaron y el ARN del ensayo Mx1 se purificó utilizando el kit de miniextracción "RNAeasy" de Qiagen. El ARN se conservó en H<sub>2</sub>O a -80 °C. Se realizó la RT-PCR de Mx1 usando química TaqMan<sup>®</sup> y se realizó un análisis sobre el instrumento de Detección de Secuencia PRISM<sup>®</sup> 7700 de Applied Biosystems (ABI). Para la transcripción inversa del ARN y amplificación del ADNc, se usó el kit "One-step TaqMan<sup>®</sup> RNA" de ABI. Durante 30 minutos se realizó la transcripción inversa del ARN a 48 °C y la amplificación se realizó en 40 ciclos con una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos y una etapa de hibridación/elongación a 60 °C durante 1 minuto. Las muestras se analizaron con una combinación específica de sonda/cebador de Mx1. La expresión de Mx1 se normalizó con respecto a la expresión de GAPDH medida en paralelo usando un ensayo convencional de ABI.

20 El ensayo se validó *in vitro* examinando la inducción del ARN de Mx1 en células L929 murinas tratadas con proteína mIFN- $\beta$  recombinante purificada (Figura 5). Se observó un aumento dependiente de la dosis en la expresión del ARN de Mx1 con un valor CE50 de aproximadamente 50 pg/ml de mIFN- $\beta$  dando como resultado un aumento de 100 veces en el nivel del ARN de Mx1.

#### **B. La Inyección en Embolada de la Proteína mIFN- $\beta$ Induce una Respuesta de Biomarcador Transitoria *In Vivo***

25 **Vivo:** La respuesta de biomarcador tras inyección en embolada de la mIFN- $\beta$  recombinante purificada se midió en estos estudios. La inducción de la expresión de ARN de Mx1 (25 a 50 veces con respecto a los ratones a los que se les había inyectado vehículo) se observó con cada concentración de mIFN- $\beta$  ensayada cuando bien administrada i.v. o bien i.m. (Figura 6). Se midieron los niveles de expresión de Mx1 más altos 2 horas después de la inyección. En ese momento, se observó una clara respuesta a la dosis cuando se suministró mIFN- $\beta$  i.m. La expresión de Mx1 disminuyó rápidamente y más allá de 12 horas después de la inyección no se detectaron niveles de ARN de Mx1 por encima del fondo. Cuando se inyectó i.v. mIFN- $\beta$ , se observó la mayor inducción con 150 ng. A la dosis de 500 ng hubo un nivel disminuido de inducción de ARN de Mx1. Este efecto saturante se ha observado en otros estudios en los que niveles de IFN- $\beta$  elevados conducen a una aparente regulación negativa de la biorrespuesta, quizá debido a una regulación negativa en el receptor de tipo I de IFN (véase por ejemplo, Mager, DE y Jusko, WJ (2002) Pharm Res 19: 1537-43). La expresión de ARN de Mx1 en los ratones a los que se inyectó por vía i.v. también tuvo un pico aproximadamente a las 2 horas postinyección y disminuyó rápidamente después de esto.

Esta es la primera vez que la expresión de ARN de Mx1 se ha usado como un biomarcador para seguir la actividad de mIFN- $\beta$  en ratones. Este resultado demuestra claramente que el ARN de Mx1 se expresa de manera constitutiva en las CMSP de ratón a un bajo nivel y puede regularse de forma positiva fuertemente por tratamiento con mIFN- $\beta$ . Sin embargo, la regulación positiva es corta y rápidamente disminuye desde niveles de expresión altos al fondo a las 12-24 horas. La cinética rápida se corresponde con un tiempo de semivida corto descrito para los interferones de tipo I en seres humanos (véase por ejemplo, Salmon, P y col. (1996) J Interferon Cytokine Res 16: 759-64; Buchwalder, P-A y col. (2000) J Interferon Cytokine Res 20: 57-66) y otras especies animales (Pepinsky, RB y col. (2001) J Pharm Exp Ther 297: 1059-55; Mager, DE y col. (2003) J Pharm Exp Ther 306: 262-70).

45 **C. Quimiocinas IP-10 y JE:** Durante el análisis de las muestras de plasma de los ratones tratados con la proteína mIFN- $\beta$ , también se identificaron dos quimiocinas murinas, IP-10 y JE, el homólogo murino de MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos, véase por ejemplo, Yoshimura, T (1989) FEBS Lett 244: 487-93), que tenían una respuesta y activación con respecto a mIFN- $\beta$  como el ARN de Mx1 (Figuras 7 y 8). 2 horas después de la administración de la proteína mIFN- $\beta$  bien i.v. o i.m., se observó una fuerte inducción de IP-10 y JE. Los niveles de IP-10 aumentaron 3000 veces a la dosis más alta suministrada i.v. Con cada una de las tres dosis de mIFN- $\beta$  ensayadas, se observó una rápida disminución al fondo en los niveles de plasma de IP-10 y JE a las 24 horas. Se observó una clara respuesta a la dosis para IP-10 y JE con ambas vías de administración.

Tal inducción fuerte dependiente de la dosis de IP-10 y JE por IFN- $\beta$  no se conocía previamente hasta que la demostraron los autores de la presente invención, como se describe en el presente documento. Aunque se sabe que IP-10 es un marcador biológico para IFN- $\gamma$  en virtud del elemento sensible a interferón (ISRE) en la región promotora (véase por ejemplo, Luster, AD y col. (1985) Nature 315: 672-76), no se había demostrado previamente que fuese un biomarcador específico para mIFN- $\beta$  en ratones.

**D. Respuesta del Biomarcador Prolongada Después de Suministro del Gen de mIFN- $\beta$  *In Vivo*:** Estos estudios demuestran la medición de la inducción de los biomarcadores mIFN- $\beta$  en ratones después de administración

intramuscular del ADN plasmídico o un vector AAV-1 que codifica mIFN- $\beta$ .

#### EJEMPLO 4: Administración de Gen mIFN- $\beta$

**A. Administración del Plásmido del Gen mIFN- $\beta$ :** Para la administración del plásmido, diferentes dosis de ADN plasmídico que codifica mIFN- $\beta$  se inyectaron i.m. en ratones seguido por electroporación del músculo inyectado. La expresión de Mx1 se midió a partir de las CMSP aisladas de cada animal individual y se expresó como el factor de aumento sobre los niveles de fondo del grupo de control (Figura 9). Hubo una fuerte regulación positiva del ARN de Mx1 (inducción de 40 a 130 veces) en los cuatro grupos que recibieron el ADN plasmídico de mIFN- $\beta$  el día 2 después de la inyección. La expresión de Mx1 en los cuatro grupos fue significativamente por encima del fondo ( $p < 0,002$ ). Los datos de expresión de Mx1 demostraron que había una respuesta a la dosis con 250  $\mu\text{g}$  como la concentración de ADN óptima. Hubo un pico inicial el primer día después de la electroporación seguido por una disminución en la expresión y en los últimos momentos los niveles de expresión disminuyeron de nuevo. Esta variación en la respuesta frente al biomarcador también se reflejó en los niveles de las quimiocinas IP-10 y JE (datos no mostrados) y parecen ser un fenómeno reproducible en otros estudios usando suministro con plásmidos de IFN- $\beta$ . El día 49 del estudio se observaron niveles significativos de inducción de Mx1.

**B. Suministro por AAV-1 del Gen de mIFN- $\beta$ :** A ratones C57Bl/6 se les inyectó ADN de pGT61 que codificaba mIFN- $\beta$  o los virus producidos del pGT61 que codifican mIFN $\beta$ , o el ADN de pGER75 que codifica SEAP (véase Materiales y Procedimientos, subsección G).

A los ratones se les extrajo sangre a los días 2, 10, 14 y 17 después de la inyección. Los ratones que recibieron el ADN de pGT61 mostraron una inducción de aproximadamente 15 veces del ARN Mx1 sobre el fondo el día 2 (Figura 10). La expresión de Mx1 continuó aumentando a más de 100 veces sobre el fondo el día 10. El día 17 el nivel de expresión de ARN de Mx1 fue aproximadamente de 180 veces por encima del fondo. No se observó expresión de Mx1 aumentada en el grupo de control que recibió ADN pGER75.

Los niveles de expresión de ARN Mx1 en los ratones inyectados con los virus producidos a partir de pGT61 fueron de aproximadamente 5 veces mayor el día 10, 14 y 17 que en ratones que recibieron el ADN de pGT61. Esto se reforzó por análisis de RT-PCR de ARN de IFN- $\beta$  realizado en los músculos inyectados. El día 17 cuando los animales se sacrificaron la expresión del ARN de mIFN- $\beta$  en el músculo fue de  $9,0 \times 10^5$  copias/ $\mu\text{g}$  de ARN en los músculos inyectados con ADN en comparación con  $2,0 \times 10^6$  copias/ $\mu\text{g}$  de ARN en los músculos inyectados con virus (datos no mostrados).

También se analizaron las muestras de plasma para IP-10 y JE (Figuras 7 y 8). Los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos para la inducción de ARN de Mx1. El día 2 los ratones que recibieron el ADN por electroporación mostraron un nivel en plasma de IP-10 superior en comparación con los ratones a los que se inyectó AAV-1-mIFN- $\beta$  expresado en virus. Sin embargo, el día 10 los niveles de IP-10 en los ratones a los que se les inyectó AAV-1-mIFN- $\beta$  mostraron un fuerte aumento y un promedio de aproximadamente 5 a 10 veces mayor que en los ratones a los que se inyectó mIFN- $\beta$  plasmídico.

**C. Sumario y Conclusiones:** El perfil farmacocinético después de la inyección en embolada de la proteína IFN- $\beta$ 1a humana es muy similar a los informes previamente publicados de los estudios usando hIFN- $\beta$ 1a administrado a voluntarios y pacientes humanos normales (véase por ejemplo, Buchwalder, P-A (2000) J Interferon Cytokine Res 20: 57-66). La proteína IFN- $\beta$ 1a humana inyectada i.v. se elimina rápidamente, y, a las 6 horas, los niveles en suero están por debajo del límite de detección del ensayo. Después de inyección i.m. de la proteína los valores máximos son menores pero la semivida en suero es prolongada. Sin embargo, la cinética aún es muy rápida y los niveles en suero caen por debajo del límite de detección a las horas. Estudios farmacocinéticos recientes en ratones, ratas y monos usando una forma PEGilada de IFN- $\beta$ 1a demuestran que la adhesión de un polímero de 20-kDa de polietilenglicol (PEG) amplía la semivida ( $t_{1/2}$ ) desde aproximadamente 1 hora a 10 horas (véase por ejemplo, Pepinsky, RB y col. (2001) J Pharm Exp Ther 297: 1059-66).

Los intentos para medir los niveles en suero de hIFN- $\beta$  después de suministro de ADN plasmídico no han tenido éxito supuestamente debido a la baja expresión del transgén, incluso aunque se han medido niveles detectables de la proteína hIFN- $\beta$  por ELISA en lisados de los músculos inyectados (datos no mostrados). Sin embargo, usando un vector AAV-1 que codifica hIFN- $\beta$ , se detectaron niveles muy altos en suero de la proteína hIFN- $\beta$  por ELISA de hIFN- $\beta$  de una manera dependiente de la dosis después de inyección i.m. Además, se midieron niveles muy estables y persistentes casi 6 meses después de la inyección. Debe observarse la ausencia de una respuesta inmunogénica aparente con respecto a la expresión de hIFN- $\beta$  como un transgén extraño en este modelo, aunque la sangre no se analizó para determinar la presencia de anticuerpos anti-hIFN- $\beta$ . Se ha descrito que el suministro de la proteína en embolada de hIFN- $\beta$  es muy inmunogénico en otros modelos animales (por ejemplo monos, véase la referencia 33). Los resultados sugieren que la administración i.m. de un vector AAV-1 que codifica hIFN- $\beta$  podría desarrollarse como una plataforma para conseguir una alta expresión transgénica durante periodos de tiempo prolongados.

Se identificaron tres biomarcadores mIFN- $\beta$  y se validaron para realizar estudios farmacocinéticos usando la proteína IFN- $\beta$  o suministro génico. Se desarrolló un ensayo RT-PCR cuantitativo muy sensible para medir la inducción del

ARN de Mx1 aislado de CMSP de ratones a los que se administró mIFN- $\beta$ . También se identificaron dos quimiocinas murinas, IP-10 y JE, como biomarcadores sensibles a IFN- $\beta$  y los ELISA comerciales permitieron el medio para cuantificar rápidamente y confirmar los resultados obtenidos con el ensayo TaqMan para Mx1. Se ensayaron dos tipos diferentes de vectores de suministro de genes, el ADN plasmídico (más electroporación) y AAV-1. La administración de la proteína mIFN- $\beta$  en embolada bien i.v. o i.m. dio como resultado una fuerte inducción aunque transitoria de los tres biomarcadores, con un valor  $T_{max}$  de aproximadamente 2 horas. Los niveles de los biomarcadores rápidamente disminuyeron al fondo a las 12 a 24 horas después de la inyección. Se observó una respuesta a la dosis para Mx1, IP-10 y JE cuando se inyectó mIFN- $\beta$  i.m. La rápida disminución en los niveles de los biomarcadores directamente refleja la rápida eliminación sistémica de IFN- $\beta$  después de la administración de la proteína en embolada.

El suministro basado en genes de mIFN- $\beta$  usando el plásmido más electroporación o un vector AAV-1 dio como resultado respuestas de biomarcadores que eran mayores que las observadas cuando se inyectaba la proteína mIFN- $\beta$ . Con ADN plasmídico se midió una respuesta frente a biomarcador a los 49 días y disminuyó a los niveles de fondo el día 63. Estos datos demuestran por primera vez que el plásmido de expresión mIFN- $\beta$  es capaz de expresar mIFN- $\beta$  biológicamente activo durante al menos 7 semanas. La cinética de la respuesta frente al biomarcador fue ligeramente diferente cuando se suministró ADN de mIFN- $\beta$  mediante un vector AAV-1. La respuesta fue relativamente baja poco después de la inyección y disminuyó durante la primera semana. La estabilización en la respuesta de biomarcadores a nivel elevado se observó en la segunda y tercera semana después de la inyección.

En resumen, se ha demostrado un perfil farmacocinético superior para el suministro basado en genes para el IFN- $\beta$  tanto humano como murino en comparación con la administración de la proteína en embolada en ratones. En primer lugar, el nivel de IFN- $\beta$  expresado es igual o mayor que los niveles conseguidos con el suministro de proteína, según se mide directamente en suero o como se refleja mediante la inducción de biomarcadores con IFN- $\beta$ . En segundo lugar, la duración de la expresión de IFN- $\beta$  a partir de una sola inyección de un vector IFN- $\beta$  es bastante más larga (expresión estable durante semanas a meses) en comparación con la cinética transitoria observada con la administración de la proteína (horas).

#### **EJEMPLO 5: Estudios de eficacia usando transferencia de mIFN- $\beta$ basada en genes**

Estos estudios demuestran que la transferencia basada en genes es eficaz en un modelo animal de EM. El modelo EAE de roedores es un modelo aceptado de EM y existen diversos informes en los que se ha demostrado que IFN- $\beta$  es activo en estos modelos (Yu, M y col. (1996) *J Imm* 64: 91-100). También se ha descrito que la transferencia de IFN- $\beta$  basada en genes es eficaz en algunos de estos modelos (véase por ejemplo, Triantaphyllopoulos, K y col., (1998) *Gene Therapy* 5: 253-63). Los resultados de estos estudios validan un modelo de EAE murino con la proteína mIFN- $\beta$  y comparan la transferencia basada en genes y la transferencia de proteínas de mIFN- $\beta$  en el modelo.

**A. Eficacia de la Proteína mIFN- $\beta$  en un Modelo de EAE Agudo de Ratón:** Se inmunizaron ratones SJL hembra de ocho semanas de vida con la proteína proteolipídica (PLP) el día 1 y después se trataron cada dos días a lo largo de la evolución del estudio con inyecciones subcutáneas (s.c.) de dosis diferentes (10.000, 20.000, 30.000 o 100.000 unidades por grupo) de la proteína IFN- $\beta$  murina recombinante. Los controles positivos usados para este estudio fueron Mesopram y Prednisolona, administrados por vía intraperitoneal (i.p.), dos veces al día.

Específicamente, el gen que codifica mIFN- $\beta$  se clonó en un vector de expresión pCEP4 (Invitrogen). El plásmido de expresión que codifica mIFN- $\beta$  se transfeció temporalmente en células 293E (Edge Biosystems) usando el Reactivo de Transfección X-tremeGene Ro-1539 (Roche). La proteína IFN- $\beta$  murina se purificó del medio mediante cromatografía de intercambio iónico y mediante cromatografía de interacción hidrófoba. El producto se sializó y se concentró frente a tampón de dilución (acetato sódico 50 mM, pH 5,5, cloruro sódico 150 mM, y propilenglicol al 5 %) y se filtró de manera estéril. Las alícuotas de la proteína purificada se conservaron a -80 °C. La actividad de la proteína purificada se evaluó usando un ensayo génico indicador de luciferasa (Hardy y col. (2001) *Blood* 97: 473-482), usando un patrón de referencia mIFN- $\beta$  comercial de Access Biomedical (San Diego, CA). La actividad específica de la proteína purificada fue de  $2 \times 10^8$  unidades/mg.

Para los estudios en animales, la mIFN- $\beta$  codificada se diluyó a 100 ug/ml en tampón de dilución. Inmediatamente antes de la inyección a los animales, se diluyó la solución madre mIFN- $\beta$  a la concentración deseada de mIFN- $\beta$ . En estos estudios el control vehículo usado fue el tampón de dilución sin mIFN- $\beta$ .

En la Figura 11 se muestran los resultados del estudio. Ratones tratados con 100.000 unidades de IFN- $\beta$  (aproximadamente 500 ng, 20 ug/kg) desarrollaron puntuaciones clínicas significativamente disminuidas de EAE en comparación con los ratones tratados con vehículo ( $p=0,0046$ ). Los ratones tratados con 30.000 unidades de IFN- $\beta$  también demostraron puntuaciones clínicas disminuidas en comparación con los ratones tratados con vehículo aunque esta disminución no alcanzó un significado estadística. Los controles positivos en este estudio, Mesopram y Prednisolona, también tuvieron puntuaciones clínicas significativamente disminuidas.

**B. La Transferencia de mIFN- $\beta$  Basada en Genes es Eficaz en el Modelo de EAE Agudo Murino:** Basándose en los resultados del estudio anterior que demuestran que la proteína mIFN- $\beta$  es eficaz en el modelo EAE Agudo murino se realizó un segundo estudio para ensayar y comparar la transferencia por plásmido de mIFN- $\beta$  con transferencia de proteína. Al igual que en el primer estudio, el día 1 a los ratones se les inyectó PLP. Para la transferencia génica, los ratones recibieron una inyección intramuscular el día 2 del estudio de PBS, ADN plasmídico nulo (pNull) con electroporación (EP), ADN plasmídico mIFN- $\beta$  (más EP) o ADN plasmídico mIFN- $\beta$  formulado con una formulación polimérica denominada "PINC" (Mumper, RJ y col (1998) J Controlled Release 52: 191-203). Para la transferencia de la proteína a los ratones se les inyectó cada dos días proteína IFN- $\beta$  murina (100.000 unidades, inyección s.c.) o vehículo.

En la Figura 12 se muestran los resultados de este estudio. Al igual que en el estudio anterior los ratones tratados con 100.000 Unidades de proteína mIFN- $\beta$  tuvieron puntuaciones clínicas significativamente disminuidas en comparación con los ratones tratados con control vehículo ( $p=0,045$ ). La transferencia génica de mIFN- $\beta$  + EP también tuvo puntuaciones clínicas significativamente disminuidas en comparación con la transferencia génica de pNull y EP ( $p= 0,0171$ ). La transferencia génica usando la formulación PINC de IFN- $\beta$  no tuvo puntuaciones clínicas estadísticamente disminuidas en comparación con pNull (datos no mostrados). Todos los resultados de este estudio se describen en la subsección A de Materiales y Procedimientos y en la Figura 13.

**C. Sumario y Conclusiones:** Se ha validado un modelo de EAE agudo murino usando la proteína mIFN- $\beta$  recombinante demostrando que la inyección cada dos días de 100.000 unidades de mIFN- $\beta$  durante el transcurso del estudio disminuye significativamente la gravedad de la enfermedad en comparación con un control vehículo. Se observó que la transferencia basada en genes de un plásmido que codifica mIFN- $\beta$  con electroporación disminuye significativamente las puntuaciones clínicas en ratones enfermos. Una sola inyección del plásmido el día 2 del estudio fue tan eficaz en reducir las puntuaciones como una inyección cada 2 días de la proteína IFN- $\beta$ . Estos resultados demuestran que la transferencia basada en genes de IFN- $\beta$  es eficaz en un modelo de EM animal.

#### **EJEMPLO 6: Expresión regulada de IFN- $\beta$ *In Vivo* Usando un Sistema de Expresión Regulada**

**A. Diseño, Construcción y Validación *In Vitro*:** Los sistemas de expresión regulados de la presente invención tienen ventajas sobre los sistemas de expresión conocidos. En una realización preferida, el sistema de la presente invención resuelve diversos desarrollos y asuntos de fabricación teniendo un solo vector un primer casete de expresión que codifica una molécula terapéutica (MT) de interés (por ejemplo, un transgén IFN- $\beta$ ) y un segundo casete de expresión que codifica una molécula reguladora (MR) que regula la expresión de la MT.

Como un ejemplo de una realización, los autores de la presente invención proporcionan un nuevo y mejorado sistema de expresión regulado. En esta realización, los casetes de expresión del sistema de expresión regulado de la presente invención están presentes en un solo vector plasmídico denominado BRES-1. El vector único BRES-1 tiene diversas características versátiles incorporadas en su diseño, incluyendo sitios de clonación múltiples (MCS) para la inserción de diferentes transgenes así como diferentes promotores para conducir la expresión de la proteína reguladora. Además, el tamaño de los casetes de expresión BRES-1 es compatible con muchos vectores de transferencia diferentes, incluyendo plásmidos y vectores AAV.

**B. Construcción de Vectores de Expresión Inducibles por mIFN- $\beta$  y hIFN- $\beta$  para Transferencia Génica:** Los genes mIFN- $\beta$  y hIFN- $\beta$  de pGER101 y pGER125, respectivamente, se transfirieron a una serie de cuatro vectores BRES-1 (Figura 14A-D). Los plásmidos resultantes tenían el casete de expresión que codificaba el gen IFN- $\beta$  murino humano y el casete de expresión que codificaba el gen de MR en cuatro orientaciones diferentes unas con respecto a las otras (Figura 15A-B). Los plásmidos BRES-1 resultantes que codifican mIFN- $\beta$  se denominaron pGT23, pGT24, pGT25 y pGT26 (Figura 15A), y los plásmidos BRES-1 resultantes que codificaban hIFN- $\beta$  se denominaron pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30 (Figura 15B). Véase Materiales y Procedimientos, subsección F para una descripción completa de la construcción de estos plásmidos.

**C. Validación *In Vitro* de los Vectores de Expresión de IFN- $\beta$ :** Los plásmidos de expresión de hIFN- $\beta$  constitutivo (pGER125) e inducible (pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30) se transfectaron en células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> musculares murinas. Las células se trataron con el inductor, MFP, y los medios se sometieron a ensayo para detectar hIFN- $\beta$  por ELISA (Figura 16). Los resultados indican poca expresión de hIFN- $\beta$  en ausencia de MFP. La expresión de IFN- $\beta$  humano de los plásmidos BRES-1-hIFN- $\beta$  se induce por MFP aproximadamente de 20 a 90 veces, a niveles de hasta aproximadamente 50 % de lo expresado con el promotor de CMV (pGER125). Comparado con un sistema de expresión de dos plásmidos (pGS1694 más pGER129), las cuatro orientaciones de los plásmidos del sistema BRES-1 presentaron una actividad basal comparable en ausencia de MFP y actividades inducidas iguales o superiores a las de dos plásmidos en presencia de MFP. Se realizó un estudio *in vitro* similar con los plásmidos mIFN- $\beta$  BRES-1 (Figura 17) y los resultados fueron muy similares a los descritos con los plásmidos hIFN- $\beta$  BRES-1.

**D. Expresión Regulada de IFN- $\beta$  *In Vivo*:** Se realizó un estudio en ratones C57Bl/6 sin tratar usando el vector plasmídico de BRES-1 mIFN- $\beta$  pGT26 que se construyó por digestión de pGER101 con Sal I, realizando extremos romos rellenando el saliente 5' con ADN polimerasa Klenow, ligando con engarces Spe I, digestión con Spe I y Not I



e inserción del fragmento resultante que portaba el gen mIFN entre los sitios Spe I y Not I de pGT4.

El vector plasmídico pGT26 se usó para ensayar si la expresión de mIFN- $\beta$  podría regularse en una manera pulsátil inactiva/activa/inactiva mediante administración oral del inductor, MFP. Los plásmidos de expresión de mIFN- $\beta$  BRES-1 constitutiva e inducible se inyectaron con electroporación en los músculos de las patas traseras de los ratones. Los ratones se trataron con MFP durante cuatro días consecutivos, comenzando el día 7 después de la inyección con el plásmido. Se extrajo sangre los días 11 y 18 después de la inyección, las CMSP se aislaron y los niveles de ARN de Mx1 se determinaron mediante RT-PCR. También se ensayaron las muestras de plasma para detectar las quimiocinas IP-10 y JE. Los resultados del estudio por análisis con biomarcador del ARN de Mx1 y se muestran análisis de quimiocinas en las Figuras 18 y 19, respectivamente. En ausencia de MFP a los 7 días se observó poca o ninguna inducción con biomarcador. Después de administración oral de MFP, todos los biomarcadores se indujeron fuertemente a niveles superiores a los niveles con mIFN- $\beta$  CMV el día 11. El día 18 los niveles de quimiocina volvieron al nivel basal y el nivel del ARN de Mx1 disminuyó casi hasta el nivel basal (véase Materiales y Procedimientos, subsección G más adelante para una descripción del estudio y controles).

**E. Sumario y Conclusiones:** Los autores de la presente invención han identificado dos vectores, un ADN plasmídico no viral y un virus adeno-asociado de tipo 1 (AAV-1), que son adecuados para la transferencia de una molécula terapéutica (MT), por ejemplo, un gen IFN- $\beta$ , para tratar una enfermedad crónica, por ejemplo, EM. Adicionalmente, los autores de la presente invención han demostrado que ambos vectores pueden transferirse al músculo esquelético por inyección intramuscular y generar niveles de expresión de IFN- $\beta$  que son medibles y persistentes en modelos animales murinos. En el caso del ADN plasmídico los autores de la presente invención han demostrado que una sola inyección de un plásmido con una mIFN- $\beta$  codificada (con electroporación) es eficaz y es tan eficaz como una inyección cada dos días de la proteína mIFN- $\beta$  en un modelo animal de EM. Los autores de la presente invención desarrollaron biomarcadores de mIFN- $\beta$  que demostraban que la expresión de mIFN- $\beta$  codificada por el plásmido persistirá durante al menos 45 días después de una sola inyección con el plásmido. En el caso del vector AAV-1 los autores de la presente invención han demostrado que una sola inyección intramuscular de un vector AAV-1 que codifica la IFN- $\beta$  humana da como resultado niveles en suero altos de la proteína IFN- $\beta$  humana que persisten durante 6 meses. Tanto el plásmido como los vectores AAV-1 han demostrado ser compatibles con el sistema de expresión regulado BRES-1 de la presente invención. Por ejemplo, los autores de la presente invención demuestran la expresión regulada de IFN- $\beta$  en ratones usando un sistema de expresión regulado por BRES-1 de una solo vector plasmídico de la presente invención.

En una realización del nuevo y mejorado sistema de expresión regulado BRES-1, los casetes de expresión están presentes en un solo vector, por ejemplo, un solo vector plasmídico. En esta realización, el único vector plasmídico BRES-1 contiene los casetes de expresión para la molécula reguladora (MR) (por ejemplo, un activador transcripcional tal como un receptor de hormona esteroide modificado) y la molécula terapéutica (MT) (por ejemplo IFN- $\beta$  humano o murino) en un solo vector de expresión plasmídico lanzadera. El vector único del sistema de expresión regulado BRES-1 contiene sitios de clonación múltiples (MCS) para simplificar la inserción o sustitución de promotores, elementos reguladores y transgenes en la estructura del plásmido. Como demuestran los autores de la presente invención en el presente documento, los únicos vectores plasmídicos BRES-1 mIFN- $\beta$  y BRES-1 hIFN- $\beta$  se construyeron y ensayaron *in vitro* y demostraron que tenían una baja actividad de fondo en ausencia de la molécula activadora (MA), el inductor de pequeña molécula MFP, y mostraron una alta inducibilidad (comparable a la de un sistema con dos plásmidos) en presencia de MFP.

Se realizó un estudio *in vivo* en ratones normales usando un vector plasmídico BRES-1 mIFN- $\beta$ , y administración oral de MFP. Usando biomarcadores para controlar los niveles de expresión de mIFN- $\beta$  los resultados mostraron una expresión de bajo fondo de los biomarcadores mIFN- $\beta$  en ausencia de MFP, una fuerte inducción después de administración de MFP y un retorno a los niveles basales de expresión después de la retirada de MFP (Figuras 18 y 19). Basándose en estos resultados los autores de la presente invención han conseguido la expresión regulada de IFN- $\beta$  *in vivo* usando el sistema de expresión regulado de la presente invención.

Por tanto, un resultado de estos estudios y las composiciones y procedimientos de la presente invención es un sistema de transferencia basado en genes para IFN- $\beta$  que proporcionará una expresión regulada prolongada de IFN- $\beta$  para el tratamiento de una enfermedad o afección, por ejemplo, una enfermedad o afección antiinflamatoria y más preferentemente EM. Los vectores de terapia génica de la presente invención pueden incorporar uno o más casetes de expresión para la transferencia de una molécula terapéutica (MT) de interés (por ejemplo, IFN- $\beta$ ) para el tratamiento de una enfermedad o afección. En una realización, el sistema de expresión regulado como se describe en el presente documento puede proporcionar una expresión renovable prolongada mediante la administración oral del inductor de pequeña molécula, MFP. El sistema BRES-1 de un solo vector es capaz de una administración repetida, por ejemplo, mediante inyección intramuscular, y permitirá el ensayo de terapia continua frente a pulsátil de IFN- $\beta$  en la clínica.

**EJEMPLO 7: Selección del vector candidato****Sistema de expresión regulado BRES-1**

**A. Orientación de BRES-1:** Los estudios *in vivo* realizados utilizaron una de las cuatro orientaciones de BRES-1 que se construyeron como se describe en la Figura 15. Como se describe en el presente documento, esto se basó en datos *in vitro* que mostraron que la construcción, pGT26, tenía el nivel más alto de expresión transgénica en presencia de MFP. Estas cuatro orientaciones BRES-1 pueden ensayarse *in vivo* usando los protocolos descritos en el presente documento para determinar cuál proporciona la mejor "ventana" de expresión transgénica (por ejemplo, el nivel de expresión basal más bajo sin MFP y el nivel de expresión más alto inducido con MFP).

**i. Efectos dependientes de la orientación sobre la expresión génica diana en plásmidos BRES-1:** Se realizó un estudio en ratones C57Bl/6 sin tratar usando los vectores plasmídicos BRES-1 mIFN- $\beta$  pGT23, 24, 25 y 26, para determinar el nivel de expresión de mIFN según se ensaya mediante el nivel de quimiocina IP-10, que sirve como un biomarcador para la expresión de mIFN. Se inyectó pGT23, pGT24, pGT25 y pGT26 con electroporación en los músculos de las patas traseras de los ratones, con 15 animales por grupo. Se extrajo sangre de cinco ratones de cada grupo el día 7 en ausencia de MFP. Los 10 ratones restantes en cada grupo se trataron con MFP durante cuatro días consecutivos, comenzando el día 7 después de la inyección con el plásmido. Se extrajo sangre los días 11 y 18 postinyección y las muestras de plasma se ensayaron para IP-10 (Véase "Diseño Experimental" para detalles). Los resultados demuestran que pGT26 ofrece la mejor combinación de baja expresión – MFP y alta expresión + MFP, coherentes con los resultados *in vitro* (Figura 32). pGT24 tuvo la mayor inducción de expresión de IP-10 pero los niveles de IP-10 en ausencia de MFP fueron más elevados que en las otras orientaciones. pGT25 tuvo niveles de IP-10 menores tanto con MFP como sin MFP, y pGT23 tuvo niveles de IP-10 con MFP aproximadamente iguales que pGT26. Sin embargo, los niveles de IP-10 con pGT24 sin MFP fueron considerablemente más elevados que para pGT26. Estos resultados indican en total un efecto dependiente de la orientación en la expresión génica diana tanto inducida como basal.

**Diseño Experimental:** Se realizó una transfección *in vivo* de plásmidos BRES-1/mIFN y comparación de las cuatro orientaciones de pBRES-1/mIFN de la siguiente manera. Ratones C57Bl/6 normales se inyectaron y electroporaron con plásmidos de expresión de IFN de ratón BRES-1 de un solo vector. La expresión de mIFN se controló mediante respuesta de biomarcador y análisis de ARN de mIFN. Los ratones estuvieron sobre una ciclo de tratamiento con MFP inactivo/activo/inactivo.

**Soluciones de ADN:** En todos los grupos que recibieron inyección cada ratón recibió 250 ug de ADN plasmídico en 150  $\mu$ l de PBS.

**Tabla 3**

Grupo	plásmido	Descripción	n*
1	pGT23	mIFN-MR	15
2	pGT24	mIFN inv-MR	15
3	pGT25	MR-mIFN	15
4	pGT26	MR-mIFN inv	15
*n=número de animales			

**Transferencia de ADN:** A ratones C57Bl/6 macho adultos se les inyectó bilateralmente el día 0 250 ug de ADN plasmídico en 150  $\mu$ l de PBS. La solución de ADN se inyectó a 25  $\mu$ l en músculo tibial y 50  $\mu$ l en el músculo gastrocnemio de cada pata trasera, seguido por electroporación con un calibrador (8 impulsos a 200 V/cm, 1 Hz, 20 ms/impulso).

**Tratamiento con MFP:** A los grupos 1-4 (todos ratones inyectados) se les administró MFP mediante sonda oral a 0,33 mg/kg (100  $\mu$ l de 0,083 mg/ml en aceite de sésamo, recién preparado) como se indica en la siguiente tabla a continuación.

Tabla 4

Grupo/plásmido	n/ nº de ratón	día 0	día 7	día 7-10	día 11	día 18
1 pGT23	15 101-115	inyectado 101-115	Extracción de sangre terminal + músculos 101-105	MFP 106-115	Extracción de sangre terminal + músculos 106-110. Extracción de sangre de la cola 111-115	Extracción de sangre terminal + músculos 111-115
2 pGT24	15 201-215	inyectado 201-215	Extracción de sangre terminal + músculos 201-205	MFP 206-215	Extracción de sangre terminal + músculos 206-210. Extracción de sangre de la cola 211-215	Extracción de sangre terminal + músculos 211-215
3 pGT25	15 301-315	inyectado 301-315	Extracción de sangre terminal + músculos 301-305	MFP 306-315	Extracción de sangre terminal + músculos 306-310. Extracción de sangre de la cola 311-315	Extracción de sangre terminal + músculos 311-315
4 pGT26	15 401-415	inyectado 401-415	Extracción de sangre terminal + músculos 401-405	MFP 406-415	Extracción de sangre terminal + músculos 406-410 Extracción de sangre de la cola 411-415.	Extracción de sangre terminal + músculos 411-415
5 no inyectados	5 501-515		Extracción de sangre terminal + músculos 501-505			
Día 7: Compara el nivel de expresión basal en ausencia de MFP. Día 11: Compara el nivel de expresión inducido después de tratamiento con MFP. Día 18: Compara la expresión después de 7 días sin tratamiento con MFP.						

**Procedimiento de extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final:** La sangre de los ratones se extrajo mediante un corte en la cola o mediante punción cardiaca (extracción sanguínea terminal) en los momentos indicados en la tabla anterior. La sangre se recogió en tubos Microtainer (que contenían EDTA) a TA (temperatura ambiente). El plasma se extrajo de las extracciones de sangre de la cola para los ensayos IP-10. Las CMSP se separaron y se recogieron a partir de extracciones de sangre terminales y el plasma restante se sometió a ensayo para IP-10 por ELISA.

**ii. Efectos dependientes de la orientación sobre la expresión génica diana en plásmidos BRES-1:** Los plásmidos BRES-1/hIFN también se ensayaron de una manera similar como se ha descrito anteriormente. Los plásmidos BRES-1/hIFN constitutivos (pGER125) o inducibles (pGT27, pGT28, pGT29 y pGT30) se inyectaron con electroporación en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6 sin tratar. Se extrajo sangre de los ratones el día 4 en ausencia de MFP, después se trataron con MFP durante cuatro días consecutivos, comenzando el día 7 después de la inyección con el plásmido. La sangre se extrajo los días 11 y 18 postinyección. El suero se recogió de sangre coagulada y las muestras se ensayaron para detectar IFN por ELISA (Véase "Diseño Experimental" más adelante para detalles).

Los resultados muestran que pGT28 ofrece la mejor combinación de baja expresión sin MFP y alta expresión con MFP, coherentes con los resultados *in vitro* (Figura 33). La expresión de hIFN - MFP el 4 día no fue detectable en ninguno de los plásmidos BRES-1/hIFN. La expresión de HIFN + MFP el día 7 fue menor que con el promotor del CMV para pGT27, pero fue mayor para pGT28, 29 y 30. La expresión de hIFN de pGT28 fue tan alta como 5 veces más que para CMV. La expresión no pudo casi detectarse en ninguno de los plásmidos BRES-1/hIFN el día 18, con pGT28 que tenía la expresión más baja en ese punto. Estos resultados en total indican un efecto dependiente de la orientación en la expresión génica diana inducida y basal.

**Diseño Experimental:** La transfección *in vivo* de plásmidos BRES-1/hIFN y comparación de las cuatro orientaciones de pBRES-1/hIFN se realizó de la siguiente manera. A ratones normales adultos C57Bl/6 se les inyectaron vectores plasmídicos que llevaban los casetes de expresión BRES-1/hIFN o CMV-hIFN. La expresión de IFN humano se ensayó a través de un ciclo inactivo/activo/inactivo de tratamiento con MFP.

**Soluciones de ADN plasmidial:** Los grupos de ratones 2-6 (plásmido) recibieron 250 ug de ADN por ratón en un volumen de 150 ul.

Tabla 5

Grupo	vector	descripción	n*
2	pGT27	hIFN-MR en plásmido	5
3	pGT28	HIFN inv-MR en plásmido	5
4	pGT29	MR-hIFN en plásmido	5
5	pGT30	MR-hIFN inv en plásmido	5
6	pGER125	CMV-hIFN en plásmido	5
*n=número de animales			

Transferencia de ADN: Para los Grupos 2-6 (plásmido), se inyectaron 25 µl de la solución de ADN en los músculos tibiales y 50 µl en el músculo gastrocnemio de cada pata trasera, seguido por electroporación con un calibrador (8 impulsos a 200 V/cm, 1 Hz, 20 ms/impulso).

Tratamiento con MFP: A los grupos 2-5 se les administró MFP por inyección i.p. a 0,33 mg/kg (100 µl de 0,083 mg/ml en aceite de sésamo, recién preparado) el día 7-10, según se indica en la siguiente tabal.

Tabla 6: Ciclo 1

Grupo plásmido	de n/ nº de ratón	de día 0	día 4	día 7-10	día 11	día 18
2 pGT27	5 201-205	plásmido inyectado y EP	extracción de sangre de la cola	MFP	extracción de sangre de la cola	extracción de sangre terminal + músculos
3 pGT28	5 301-305	plásmido inyectado y EP	extracción de sangre de la cola	MFP	extracción de sangre de la cola	extracción de sangre terminal + músculos
4 pGT29	5 401-405	plásmido inyectado y EP	extracción de sangre de la cola	MFP	extracción de sangre de la cola	extracción de sangre terminal + músculos
5 pGT30	5 501-505	plásmido inyectado y EP	extracción de sangre de la cola	MFP	extracción de sangre de la cola	extracción de sangre terminal + músculos
6 pGER125	5 601-605	plásmido inyectado y EP	extracción de sangre de la cola		extracción de sangre de la cola	extracción de sangre terminal + músculos
7 no inyectado	5 701-705					extracción de sangre terminal + músculos

Procedimiento de Extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final: A los ratones se les extrajo sangre mediante un corte en la cola o punción cardiaca (extracción de sangre terminal) en los momentos indicados en la tabla anterior. La sangre se recogió en tubos Microtainer (sin anticoagulantes). El suero se separó y se recogió de la sangre y después se ensayó para detectar hIFN por ELISA.

5 **iii. Efectos dependientes de la orientación de la expresión génica diana en plásmidos BRES-1:** Los plásmidos BRES-1/hEPO también se ensayaron de una manera similar a la comentada anteriormente. Se inyectaron los  
10 vectores inducibles de un plásmido BRES-1/hEPO (pGT15, pGT16, pGT17 y pGT18) o de dos plásmidos (pGS1694 + pEP1666) con electroporación en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6 sin tratar, con 10 animales por grupo. Cinco ratones de cada grupo se trataron con MFP durante cuatro días consecutivos, comenzando el día 7 después de la inyección con el plásmido y cinco ratones de cada grupo no recibieron MFP. La  
15 sangre se extrajo el día 10 postinyección, 6 horas después del último tratamiento con MFP. El suero se extrajo a partir de sangre coagulada y las muestras se ensayaron para detectar hEPO por ELISA (Véase Diseño Experimental a continuación para detalles). Los resultados demuestran que los niveles de expresión inducidos son mayores que los del sistema con dos plásmidos para 3 de los 4 plásmidos BRES-1/EPO y que los niveles de expresión varían con la orientación, coherentes con los plásmidos mIFN y hIFN de BRES-1 (Figura 34A). Los resultados demuestran una buena correlación entre la expresión EPO y niveles de hematocrito (Figura 34B), demostrando un efecto fisiológico de la expresión génica EPO inducible. Estos resultados en total indican un efecto de orientación tanto en la expresión génica diana basal como inducida.

20 **Diseño Experimental:** Se realizó una transfección *in vivo* de los plásmidos BRES-1/hEPO y una comparación de las cuatro orientaciones de pBRES-1/hEPO con los sistemas de expresión regulados por dos plásmidos de la siguiente manera. A ratones C57Bl/6 adultos normales se les inyectaron vectores plasmídicos BRES-1/hEpo o el sistema de expresión regulado por dos plásmidos con Epo como el gen diana sensible a GS. La expresión de Epo humano se ensayó en ausencia y en presencia de tratamiento con MFP. El siguiente protocolo consiste en cinco grupos de ratones (N=10, en el que "N" es el número de animales). Para cada grupo, a los diez ratones se les inyectó o  
25 introdujo por electroporación con uno de los 4 plásmidos pBRES-1 o los dos plásmidos. Un grupo adicional de N=10 (Grupo 6) no se inyectó para controles negativos.

30 Para cada extracción de sangre en la cola o extracción de sangre terminal más adelante, se recogieron 10 µl de sangre inmediatamente para un ensayo de hematocrito y también se recogió suero del resto de la sangre. Véase más adelante en "Procedimiento de Extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final". Para cada uno de los grupos 1-5, el día 7 a cinco ratones se les inyectó MFP los días 7-10 por la mañana y se extrajo sangre de la cola el día 10 por la tarde, aproximadamente 6 horas después de la última inyección con MFP (muestras inducidas). Los cinco ratones restantes en cada grupo no se indujeron con MFP y se realizó una extracción de sangre terminal el día 11 (las extracciones de sangre terminales fueron necesarias para niveles no inducidos precisos). Al grupo 6 se le realizó una extracción de sangre terminal el día 11.

35 Por tanto, en este experimento, el sistema pBRES-1 y de dos plásmidos se comparó con los niveles no inducidos e inducidos de MFP y también se comparó con niveles constantemente inducidos a lo largo del tiempo.

**Soluciones de ADN plasmídico:** Los ratones del grupo 1 recibieron 100 µg de cada plásmido por ratón en un volumen de 150 µl. Los ratones del grupo 2-5 recibieron 200 µg de ADN por ratón en un volumen de 150 µl.

Tabla 7

Grupo	vector	descripción	n*
1	pGS1694 pEP1666	Pro actina-GS Epo sensible a GS	10
2	pGT15	hEpo-MR	10
3	pGT16	hEpo inv-MR	10
4	pGT17	MR-hEpo	10
5	pGT18	MR-hEpo inv	10
*n=número de animales			

40 **Transferencia de ADN:** Se inyectaron 25 ul en el músculo tibial y se inyectaron 50 µl en el músculo gastrocnemio de cada pata trasera, seguido por electroporación con un calibrador (8 impulsos a 200 V/cm, 1 Hz, 20 ms/impulso).

**Tratamiento con MFP:** A los ratones se les administró MFP mediante inyección i.p. de 100 µl de solución MFP a 0,083 mg/ml en aceite de sésamo).

Tabla 8

Grupo/ Plásmido	n*/ nº de ratón	día 0	día 7-10	día 10
1) pGS1694 + pEP1666	10 101-110	plásmido inyectado y EP	MFP i.p. 101-105	extracción de sangre por la cola 101-105 extracción de sangre terminal 106-110
2) pGT15	10 201-210	plásmido inyectado y EP	MFP i.p. 201-205	extracción de sangre por la cola 201-205 extracción de sangre terminal 206-210
3) pGT16	10 301-310	plásmido inyectado y EP	MFP i.p. 301-305	extracción de sangre por la cola 301-305 extracción de sangre terminal 306-310
4) pGT17	10 401-410	plásmido inyectado y EP	MFP i.p. 401-405	extracción de sangre por la cola 401-405. extracción de sangre terminal 406-410
5) pGT18	10 501-510	plásmido inyectado y EP	MFP i.p. 501-505	extracción de sangre por la cola 501-505. extracción de sangre terminal 506-510
6 No inyectado	10 601-610			extracción de sangre terminal 601-610
*n=número de animales				

**Procedimiento de Extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final:** A los ratones se les extrajo sangre mediante un corte en la cola o mediante punción cardiaca (extracción de sangre terminal) en los puntos de tiempo indicados en la tabla anterior. La sangre se recogió en tubos Microtainer (sin anticoagulante), se dejó coagular, se centrifugó y se recogió el suero. El suero se ensayó para detectar hEPO por ELISA.

**Hematocrito:** Se recogieron aproximadamente 10 µl de sangre (aspirada) directamente a partir de un corte en la cola en un tubo capilar, sellado con arcilla y se centrifugó durante ~5 min a -10.000 g a los 10 minutos después de la recogida. La sangre se separó en el tubo capilar en 3 capas, es decir: los eritrocitos en el fondo (volumen total 40-50 %), una pequeña "capa leucoplaquetaria" (leucocitos y plaquetas) y el plasma restante. Se usó un medidor deslizable para leer el hematocrito (porcentaje de eritrocitos con respecto a sangre total).

**B. Estructura de BRES-1:** Cualquiera de las modificaciones estructurales de plásmidos de los vectores BRES-1 de la presente invención, como se describe en el presente documento, que demuestran un aumento significativo en el nivel y/o duración de la expresión transgénica (como se determina mediante los procedimientos descritos en el presente documento) pueden incorporarse en los vectores BRES-1 de la presente invención. Modificaciones adicionales a los vectores BRES-1 de la presente invención pueden incluir el uso de un promotor más fuerte. Este tipo de modificación es relativamente fácil de ensayar debido al diseño modular del sistema BRES-1.

**C. Ensayo del Vector/BRES-1:** Estudios farmacocinéticos y de eficacia realizados por los autores de la presente invención han empleado casetes de expresión de IFN-β utilizando el potenciador promotor del CMV. El sistema de expresión BRES-1 de la presente invención puede ajustarse para satisfacer una necesidad terapéutica particular como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en ratones sin tratar C57Bl/6 pueden ensayarse cambios o modificaciones de los vectores o casetes de expresión de la presente invención. Estos estudios pueden realizarse, por ejemplo, para: 1) determinar la dosis óptima del vector y molécula activadora (MA) (por ejemplo, inductor de pequeña molécula MFP) necesaria para conseguir niveles terapéuticos de una molécula terapéutica (MT) (por ejemplo, IFN-β) sistémicamente bien para paradigmas de tratamiento continuo o pulsátiles y 2) determinar la duración de la expresión transgénica a lo largo del tiempo, así como para definir el tiempo óptimo para una administración repetida del vector e inductor. Una vez establecidos estos parámetros en ratones (u otros animales adecuados), entonces puede establecerse un perfil farmacocinético superior de transferencia basada en genes frente a transferencia de proteínas (por ejemplo, nivel de expresión, persistencia de expresión, expresión renovable) usando estas condiciones de transferencia optimizadas en otras especies, preferentemente primates no humanos.

#### EJEMPLO 8: Selección del vector candidato

La selección del tipo de vector puede determinarse por estudios específicos. Por ejemplo, para el ADN plasmídico

puede determinarse si la electroporación es un componente deseable de inyección intramuscular para obtener un nivel terapéutico de la molécula terapéutica (MT), por ejemplo, un nivel terapéutico de IFN- $\beta$ . Si la administración por electroporación del vector de terapia génica de la presente invención es deseable, entonces, como se describe en el presente documento y adicionalmente a partir de los que se sabe en la técnica, puede diseñarse de manera fácil y aceptable clínicamente un dispositivo y un protocolo. Por ejemplo, para vectores AAV-1 de la presente invención, puede determinarse si la administración repetida del vector es deseable basándose en las posibles propiedades inmunogénicas indicadas para los vectores AAV (véase por ejemplo, Chirmule, N y col. (2000) J Virol 74: 2420-25).

**A. Procedimientos para Mejorar la Transfección de Músculo Esquelético Usando ADN Plasmídico:** El ADN plasmídico es un vector deseable para la transferencia basada en genes debido a que es simple, no inmunogénico, y fácil de producir y de fabricar. Se han desarrollado diversos procedimientos diferentes para mejorar la eficacia de la transfección en el músculo esquelético (SkM) del ADN plasmídico por inyección intramuscular. Estos procedimientos incluyen el uso de enzimas tales como hialuronidasa para tratar el músculo y la matriz extracelular que lo rodea antes de la transferencia (véase por ejemplo, Mennuni, C y col. (2002) Hum Gene Ther 13: 355-65), diversas formulaciones poliméricas (véase por ejemplo, Mumper, RJ y col. (1998) J Controlled Release 52: 191-203; Nicol, F y col. (2002) Gene Ther 9: 1351-58) así como dispositivos tales como electroporación (véase por ejemplo, Aihara, H y col. (1998) Nat. Biotech 16: 867-70; Bloquel, C y col (2004) J Gene Med 6: S11-S23) o ultrasonido (véase por ejemplo, Schratzberger, P y col. (2002) Mol Ther 6: 576-83). También se ha observado que la transferencia intravascular de ADN plasmídico a SkM de la pata usando alta presión y grandes volúmenes (procedimiento "manguito") es eficaz consiguiendo una alta transfección en una amplia distribución del ADN plasmídico a este tejido diana (véase por ejemplo, Budker, V y col. (1998) Gene Ther 5: 272-76). Se ha descrito que todos estos procedimientos de electroporación y de transferencia intravascular son más eficaces y se ha observado en diversos modelos animales que potencian la transfección del ADN plasmídico en SkM en dos a tres órdenes de magnitud sobre el ADN desnudo en solitario (véase por ejemplo, Bloquel, C y col (2004) J Gene Med 6: S11-S23; Qian, HS y col. (2004) Mol Ther 9: Sup 1, S91). Usando ADN plasmídico los inventores de la presente invención han demostrado que se consiguen niveles detectables de IFN- $\beta$  en el suero (proteína IFN- $\beta$  medible en el suero, respuesta a biomarcador o eficacia) cuando se ha empleado electroporación con la transferencia de ADN plasmídico.

Los dispositivos de electroporación adecuados para el uso clínico en la transferencia de ADN plasmídico de IFN- $\beta$  pueden evaluarse y determinarse ensayando en conejos y en otros animales más grandes usando procedimientos descritos en el presente documento conocidos en la técnica. Los dispositivos de electroporación que pueden ser adecuados para dichos ensayos y usos puede incluir aquellos desarrollados por Inovio AS, Ichor Medical Systems, Genetronics, Inc. Genetronics ha descrito el ensayo de un dispositivo en seres humanos (presentación no publicada en Gordon Research Conference on Bioelectrochemistry, 25-30 de julio, NH). Inovio también ha presentado los resultados de ensayos de tecnología de electroporación en voluntarios humanos (véase por ejemplo, Kjelen, R y col. (2004) Mol Ther 9: Sup 1, S60). Ichor Medical Systems ha descrito recientemente el desarrollo de un dispositivo de electroporación adecuado para la transferencia del ADN terapéutico (véase por ejemplo, Evans, CF y col. (2004) Mol Ther 9: Sup 1, S56).

Usando un plásmido que codifica un gen indicador LacZ los autores de la presente invención han demostrado una alta eficacia de transfección al músculo esquelético de las patas traseras de rata usando transferencia intraarterial de una solución plasmídica. Mirus ha descrito recientemente un procedimiento de transferencia intravenoso para la transferencia de ADN plasmídico con un volumen disminuido en una presión disminuida que puede ensayarse para la transferencia de plásmido a SkM usando procedimientos descritos en el presente documento conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Hagstrom, JE y col. (2004) Mole Ther 10: 386-98).

Pueden ensayarse procedimientos distintos de la electroporación o transferencia intravascular para potenciar la captación del ADN plasmídico a SkM y la posterior expresión del transgén y determinarse su idoneidad para la transferencia de ADN plasmídico usando los procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. En este sentido, se han descrito determinados agentes químicos para potenciar la captación del vector a SkM que pueden ensayarse y pueden ser adecuados para su uso en la transferencia de vectores plasmídicos de la presente invención, incluyendo formulaciones poliméricas y péptidos antenapedia (AP). Por ejemplo, "F68" es una formulación poloxamérica que puede usarse para formular y transferir ADN plasmídico y se ha descrito que potencia la transferencia de ADN plasmídico a SkM aproximadamente 10 veces (véase por ejemplo, Mumper, RJ y col. (1998) J Controlled Release 52: 191-203; Qian, HS y col. (2004) Mol Ther 9: Sup 1, S91). Se ha descrito que los péptidos antenapedia (PA) y otros péptidos de similar composición facilitan el transporte de macromoléculas grandes a través de la membrana celular (véase por ejemplo, Bucci, M y col. (2000) Nat. Med 6: 1362-67; Gratton, J-P y col. (2003) Nat Med 9: 357-62).

**B. Procedimientos para Aumentar el Nivel y la duración de la Expresión de IFN- $\beta$  a partir de Vectores de ADN Plasmídicos:** Además de evaluar determinados agentes químicos que potencian la captación de ADN plasmídico a SkM, se han usado diversas estrategias para aumentar el nivel y duración de la expresión del transgén a partir de vectores de ADN plasmídicos de la presente invención. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación de secuencias de ADN bacterianas del ADN plasmídico para crear plásmidos circulares que solo contienen el casete de expresión ("ADN minicircular"), da como resultado una expresión transgénica de 10 a 100 veces mayor (usando el factor IX y

alfal-antitripsina como transgenes) en comparación con ADN plasmídico convencional después de transfección de hígado en ratones (véase por ejemplo, Chen, Z-Y y col. (2003) *Mol Ther* 8: 495-500). Se ha demostrado que la eliminación de secuencias de ADN bacteriano que están enriquecidas en regiones CpG disminuye el silenciamiento de la expresión transgénica y da como resultado una expresión más persistente de los vectores de ADN plasmídicos (véase por ejemplo, Ehrhardt, A y col. (2003) *Hum Gene Ther* 10: 215-25; Yet, NS (2002) *Mol Ther* 5: 731-38; Chen, ZY y col. (2004) *Gene Ther* 11: 856-64). Los sistemas de expresión regulados de la presente invención pueden modificarse usando dichas estrategias para aumentar y prolongar el nivel de expresión transgénica usando vectores de ADN plasmídicos. En una realización preferida, un vector plasmídico BRES-1 que codifica IFN- $\beta$  se modifica para aumentar y prolongar el nivel de expresión transgénica.

En una realización, la expresión del transgén IFN- $\beta$  en el sistema de expresión regulado de la presente invención se condujo mediante el promotor de citomegalovirus (CMV) fuerte para expresar de manera constitutiva IFN- $\beta$ . Se ha descrito que la expresión basada en genes usando el promotor del CMV experimenta silenciamiento a través de una amplia metilación de la región promotora *in vivo* (véase por ejemplo, Brooks, A y col. (2004) *J Gene Med* 6: 395-404). Además los resultados del estudio *in vivo* por los autores de la presente invención usando el vector plasmídico para terapia génica BRES-1 pGT26-mIFN- $\beta$  demostraron niveles superiores de IFN- $\beta$  usando el casete de expresión BRES-1 en comparación con los niveles conseguidos usando el casete de expresión conducido por CMV (véase por ejemplo, el Ejemplo 6). Dados estos resultados el sistema de expresión IFN- $\beta$  BRES-1 de la presente invención puede generar de manera significativa niveles de expresión más elevados y más persistentes que cuando esto se había observado usando el casete de expresión de ADN plasmídico conducidos por CMV y por lo tanto es adecuado para examinar la transferencia de vector plasmídico BRES-1 sin electroporación.

En una realización preferida, el procedimiento de administración es por inyección intramuscular de una solución plasmídica de IFN- $\beta$  en ausencia de electroporación. Los niveles detectables de IFN- $\beta$  en suero pueden ensayarse administrando vector plasmídico por inyección intramuscular a ratones sin tratar. Una caracterización completa del nivel de expresión y persistencia del casete de expresión BRES-1 puede realizarse y compararse con los vectores de CMV previamente usados. Las formulaciones del plásmido que incluyen poloxámero F68 y péptidos Antennapedia pueden ensayarse para detectar su capacidad para potenciar la transfección plasmídica de SkM y posterior expresión transgénica de IFN- $\beta$ . Por último, pueden explorarse modificaciones de la estructura del vector plasmídico (por ejemplo, eliminación de secuencias bacterianas) como un medio para aumentar y prolongar la expresión transgénica.

**C. Vectores AAV-1:** El virus adenoasociado (AAV) es un virus de ADN bicatenario (parvovirus) que inicialmente se aisló como un contaminante en aislados adenovirales de seres humanos. AAV tiene diversas características que lo hacen particularmente atractivo como un vector para terapia génica. Además de su naturaleza no patógena y deficiente en replicación en ausencia de un virus auxiliar contiene un genoma muy simple que consiste solo en dos genes, rep y cap. Estos genes se sustituyen en los vectores AAV recombinantes por el transgén deseado flanqueado por las repeticiones terminales invertidas características 5' y 3' (ITR) de aproximadamente 135 pares de bases cada una. Las ITR son los únicos componentes restantes del ADN derivado de AAV requerido para la transferencia de vectores. Hasta ahora estudios han demostrado que los vectores AAV recombinantes sin el gen rep no se integran *in vivo* sino que en su lugar forman unas estructuras concatémicas grandes que permanecen episomales en células que no se dividen (véase por ejemplo, Duan, D y col. (1998) *J Virol* 72: 8568-77; Vincent-Lacaze, N y col. (1999) *J Virol* 73: 1949-55; Schnepf, BC y col. (2003) *J Virol* 77: 3495-3504).

AAV tiene una capacidad relativamente pequeña para ADN, aproximadamente 4,5 kb, pero esta es normalmente suficiente para alojar todos menos los transgenes terapéuticos mayores. AAV2 se ha ensayado en estudios de terapia génica humana y se ha demostrado que proporciona una expresión a largo plazo y una inflamación mínima (véase por ejemplo, Silwell, JL y Samulski, RJ (2003) *BioTechniques* 34: 148-59). Recientemente, se ha demostrado que serotipos AAV alternativos tienen excelente eficacia de transfección a SkM además de características de expresión a largo plazo de este sistema de vector (véase por ejemplo, Grimm, D y Kay, MA (2003) *Curr Gene Ther* 3: 281-304). Los estudios de los autores de la presente invención usando el vector AAV-1 que expresa luciferasa bajo un promotor del CMV han demostrado una alta expresión que persiste más allá de 12 meses después de inyección intramuscular en la pata trasera de los ratones (véase por ejemplo, Qian, HS y col. (2004) *Mol Ther* 9: Supp 1, S60). Se ha descrito expresión persistente de hEPO de más de cinco años en primates no humanos (véase por ejemplo, Xiao, W y col. (1999) *J Virol* 73: 3994-4003).

Como se describe en el presente documento los autores de la presente invención han ensayado los vectores de expresión AAV-1 IFN- $\beta$  (expresión constitutiva usando el promotor/potenciador del CMV) para demostrar niveles fuertes de la proteína hIFN- $\beta$  así como respuestas biomarcadoras mIFN- $\beta$  después de inyección intramuscular en las patas traseras de ratones C57Bl/6.

Seleccionando un vector de transferencia basado en virus para el tratamiento de una enfermedad crónica tal como EM, los sistemas de expresión regulados de la presente invención pueden ensayarse usando procedimientos como se describe en el presente documento o conocidos en la técnica para determinar su capacidad para demostrar no solo la expresión prolongada del transgén terapéutico sino también la capacidad de readministrar el gen (véase por ejemplo, Chirmule, N y col. (2000) *J Virol* 74: 2420-25). Para determinar si AAV-1 es un vector adecuado para la



readministración, se han realizado estudios, por ejemplo, usando el vector candidato, AAV-1 y AAV-2, el serotipo que se piensa que es el más frecuente en la población humana. Dicha estrategia puede usarse para determinar: 1) si los anticuerpos preexistentes contra AAV2 o AAV-1 afectarán a la capacidad para transferir y expresar genes que codifican un vector AAV-1 y 2) si un vector AAV-1 puede readministrarse a una dosis suficiente para mantener niveles terapéuticos de IFN-β en ratones. Los vectores que expresan tanto el gen indicador luciferasa como el terapéutico, IFN-β murino, en los vectores AAV-1 o AAV2 pueden administrarse i.m. a diferentes dosis y supervisarse la expresión transgénica. Después de cuatro semanas el vector puede readministrarse y de nuevo puede supervisarse la expresión transgénica. Los anticuerpos neutralizantes pueden medirse *ex vivo* para determinar la capacidad del suero de ratón inmunizado de inhibir la captación viral en un ensayo basado en células.

**i. Actividad *in vivo* de un vector pBRES-1-hIFN AAV:** Se realizó un estudio en ratones C57Bl/6 sin tratar usando el vector hIFN-β BRES-1 AAV, AAV-1 GT58 inyectado en los músculos de las patas traseras de los ratones. A los ratones se les extrajo la sangre el día 4 en ausencia de MFP, después se trataron con MFP durante 4 días consecutivos, comenzando el día 7 después de la inyección con el plásmido. La sangre se extrajo los días 11 y 18 postinyección. El suero se recogió de sangre coagulada y las muestras se ensayaron para hIFN por ELISA (Véase "Diseño Experimental" más adelante para detalles). Después, los ratones se sometieron a siete ciclos más de tratamientos con MFP y las extracciones de sangre se separaron aproximadamente de seis a ocho semanas. Cada ciclo consistió en una extracción de sangre 3 días antes del tratamiento con MFP, después 4 días con MFP, y después una extracción de sangre el día después del último día de MFP, después otra extracción de sangre 7 días después de esto. Los resultados muestran una expresión de hIFN muy inducible, con un máximo de aproximadamente 3 meses después de la inyección a un nivel tanto como 75 veces más elevado que cuando se obtiene con el plásmido BRES-1/hIFN más fuerte (Figura 35). La expresión de hIFN disminuyó gradualmente a lo largo del tiempo y la expresión de fondo - MFP permaneció baja a lo largo del transcurso del experimento. Esto demuestra una expresión inducible persistente prolongada (véase también Ejemplo 9B) de un gen diana terapéutico a partir de un vector AAV.

**Diseño Experimental:** A ratones C57Bl/6 adultos normales se les inyectó un vector AAV que llevaba los casetes de expresión BRES-1/hIFN de la siguiente manera. La expresión de IFN humano se ensayó a través de ciclos múltiples activos/inactivos/activos de tratamiento con MFP.

**Solución viral:** Los ratones de grupo 1 (AAV) recibieron  $5 \times 10^{10}$  partículas virales (pv) por ratón en un volumen de 75 µl.

**Tabla 9**

Grupo	vector	Descripción	n*
1	AAV-1-GT58	MR-hIFN inv en AAV-1	5
*n=número de animales			

**Tratamiento con MFP:** Al grupo 1 se le administró MFP por inyección i.p. a 0,33 mg/kg (100 ul de 0,083 mg/ml en aceite de sésamo, recién preparada) el día 7-10, como se indica en las siguientes tablas a continuación.

**Tabla 10: Ciclo 1-3: semanas 1-12**

Grupo	n*/ nº de ratón	día 0	día 4	día 7-10	día 11	día 18
AAV-1-GT58	5/ 101-105	virus inyectado	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

Grupo	n*/ nº de ratón	día 39	día 42-45	día 46	día 53
AAV-1-GT58	5/ 101-105	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

Grupo	n*/ n° de ratón	día 81	día 84-87	día 88	día 95
AAV-1-GT58	5/ 101-105	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

Tabla 11: Ciclo 4-8: meses 4-11

Grupo	n*/ n° de ratón	Día 123	día 126-129	día 130	día 137
AAV-1-GT58	5 101-105	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

Grupo	n*/ n° de ratón	día 165	día 168-171	día 172	día 178
AAV-1-GT58	5/ 101-105	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

5

Grupo	n*/ n° de ratón	día 221	día 224-227	día 228	día 235
AAV-1-GT58	5*/ 101-105	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

Grupo	n*/ n° de ratón	día 284	día 287 -290	día 291	día 298
AAV-1-GT58	5/ 101-105	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

Grupo/ plásmido	n*/ n° de ratón	día 340	día 343 -346	día 347	día 354
AAV-1-GT58	5/ 101-105	extracción de sangre por la cola	MFP	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

\*n=número de animales

10 **Procedimiento de Extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final:** A los ratones se les extrajo sangre por corte en la cola en los momentos de tiempo indicados en la tabla anterior. La sangre se recogió en tubos Microtainer (sin anticoagulante) y se centrifugó por separación y se recogió suero. El suero se analizó para detectar hIFN por ELISA.

#### EJEMPLO 9: Terapia génica usando un sistema de expresión regulado

15 **A. Estudios de Dosis/Respuesta y Cinéticos:** Pudieron realizarse estudios de dosis/respuesta para determinar la cantidad del vector para terapia génica de la presente invención para transferencia, bien transferencia por plásmido o por AAV-1, que es necesaria para conseguir niveles terapéuticos de la molécula terapéutica (MT) (por ejemplo, IFN- $\beta$ ) en ratones (u otros animales adecuados). En una realización, el nivel terapéutico se define como el nivel inducido de la molécula terapéutica (MT), por ejemplo un transgén que codifica una proteína terapéutica, conseguido sistémicamente por el vector que es equivalente al nivel de proteína terapéutica conseguida por una cantidad

terapéutica de embolada de la proteína terapéutica proporcionada en seres humanos sobre una base mg/kg. Por ejemplo, en una realización preferida, el nivel terapéutico se define como el nivel inducido de IFN-β conseguido sistémicamente mediante un vector de terapia génica de la presente invención que es equivalente al nivel de IFN-β conseguido mediante una cantidad terapéutica de proteína IFN-β en embolada proporcionado en seres humanos sobre una base mg/kg. En seres humanos la actual dosis única de IFN-β1a es de 30 ug o 44 ug (Rebif).

Además, puede realizarse un perfil farmacocinético completo de la expresión de la molécula terapéutica (MT) usando una molécula activadora (MA) para determinar la dosis/respuesta de la MA así como la cinética de inducción de la expresión de MT después de la administración de MA. Por ejemplo, en una realización preferida, puede realizarse un perfil farmacocinético completo de expresión de IFN-β con el MFP inductor para determinar la dosis/respuesta de MFP, así como la cinética de inducción de IFN-β después de la administración de MFP.

**i. Dosis/respuesta de MFP y reinyección del plásmido con un plásmido BRES-1/mIFN *in vivo*:** Se realizó un estudio en ratones C57Bl/6 sin tratar usando el vector plasmídico mIFN-β BRES-1 pGT26 para determinar el nivel de expresión de mIFN en respuesta a diversas dosis de MFP, según se ensaya mediante el nivel de quimiocina IP-10. pGT26 se inyectó con electroporación en los músculos de las patas traseras de ratones y los animales se trataron con MFP a 0,0033 mg/kg a 1,0 mg/kg el día 7-10 después de la inyección con el plásmido. La sangre se extrajo los días 11 postinyección y las muestras de suero se ensayaron para detectar IP-10 (véase "Diseño Experimental" más adelante para detalles). Los resultados muestran un aumento dependiente de la dosis de MFP en los niveles de IP-10 (Figura 36). No hubo incremento sobre el fondo en los niveles de IP-10 en ausencia de MFP o a 0,0033 mg/kg. Los niveles de IP-10 después aumentaron de 0,01 a 1,0 mg/kg de MFP. Se realizó un segundo y tercer ciclo de inducción con MFP a las mismas concentraciones el día 39 y 67. El día 67 el nivel de IP-10 había disminuido varias veces a partir del nivel del día 11 de manera que el ADN plasmídico se reinyectó el día 77. Se realizó otro ciclo de tratamiento con MFP y a los ratones se les extrajo sangre el día 88. Los resultados muestran una inducción renovada de la expresión de IP-10 con respecto a los mismos niveles que los del día 11. Se realizaron dos ciclos con MFP más los días 102 y 137 y aún se observó una respuesta a la dosis de MFP con una disminución gradual en los niveles de IP-10 a lo largo del tiempo. Posteriormente, el ADN plasmídico se inyectó una tercera vez el día 189, y el siguiente ciclo de MFP y la extracción de sangre el día 200 de nuevo mostró una fuerte respuesta a la dosis de MFP con expresión IP-10 renovada aproximadamente a los mismos niveles que los del día 11 y 88. Esto demuestra una correlación positiva de la expresión del gen diana con una dosis inductora y también una persistencia y renovación de la expresión del gen con la administración repetida del vector plasmídico (véase el Ejemplo 9B a continuación).

Para estudios de seguridad en seres humanos, puede realizarse una caracterización completa de la tasa a la cual la molécula activadora (MA) y la expresión de MT puede "desactivarse" después de la eliminación de la MA. Puede evaluarse la frecuencia de la dosificación de MA necesaria para conseguir niveles de estado de equilibrio estacionario de la MT. En una realización preferida, puede evaluarse una caracterización completa de la tasa a la cual la expresión de MFP e IFN-β puede desactivarse después de la retirada del inductor. Además, puede evaluarse la frecuencia de la dosificación de MFP necesaria para conseguir niveles de estado de equilibrio estacionario de IFN-β.

**Diseño Experimental:** A ratones C57Bl/6 normales se les inyectó y se les electroporó un solo plásmido de expresión de IFN murino BRES-1 de un solo vector y se trató con diversas dosis de MFP y se ensayó la expresión de mIFN por respuesta a biomarcador de la siguiente manera.

Tabla 12

Grupo	MFP (mg/kg)	n*
1	0	5
2	0,0033	5
3	0,01	5
4	0,033	5
5	0,10	5
6	0,33	5
7	1,00	5

Tabla 13

Grupo/ plásmido	n*/ nº de ratón	día 0	día 7-10	día 11	día 18
1 pGT26	5/ 101-105	ADN inyectado	100 $\mu$ l de aceite de sésamo	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
2 pGT26	5/ 201-205	ADN inyectado	MFP 100 $\mu$ l de 0,00083 mg/ml = 0,0033 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
3 pGT26	5/ 301-305	ADN inyectado	MFP 100 $\mu$ l de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
4 pGT26	5/ 401-405	ADN inyectado	MFP 100 $\mu$ l de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
5 pGT26	5/ 501-505	ADN inyectado	MFP 100 $\mu$ l de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
6 pGT26	5/ 601-605	ADN inyectado	MFP 100 $\mu$ l de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
7 pGT26	5/ 701-705	ADN inyectado	MFP 100 $\mu$ l de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
8 no inyectado	5/ 801-805		100 $\mu$ l de aceite de sésamo	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
9 no inyectado	5/ pool			extracción de sangre terminal	

Tabla 14

Grupo	plásmido	descripción	n*
1-7	pGT26	BRES-1/mlFN inv	35
*n=número de animales			

**Soluciones de ADN:** Cada ratón recibió 250  $\mu$ g de ADN plasmídico en 150  $\mu$ l de PBS.

- 5 **Transferencia de ADN:** A ratones C57Bl/6 macho adultos se les inyectó bilateralmente el día 0 250  $\mu$ g de ADN plasmídico por ratón en 150  $\mu$ l de PBS. La solución de ADN se inyectó 25  $\mu$ l en músculo tibial y 50  $\mu$ l en el músculo gastrocnemio de cada pata trasera seguido por electroporación con un calibrador (8 impulsos a 200 V/cm, 1 Hz, 20 ms/impulso).

- 10 **Tratamiento con MFP:** Como se indica en las tablas anteriores y a continuación, los grupos 1-7 recibieron 100  $\mu$ l de aceite de sésamo en solitario o con MFP a diversas concentraciones mediante inyección i.p. los días 7-10.

Tabla 15: Ciclo 1

Grupo/ plásmido	n*/ nº de ratón	día 0	día 7-10	día 11	día 18
1 DGT26	5/ 101-105	ADN inyectado	aceite de sésamo 100 $\mu$ l	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
2 pGT26	5/ 201-205	ADN inyectado	MFP 100 $\mu$ l de 0,00083 mg/ml = 0,0033 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola

(continuación)

Grupo/ plásmido	n*/ nº de ratón	día 0	día 7-10	día 11	día 18
3 pGT26	5/ 301-305	ADN inyectado	MFP 100 µl de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
4 pGT26	5/ 401-405	ADN inyectado	MFP 100 µl de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
5 pGT26	5/ 501-505	ADN inyectado	MFP 100 µl de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
6 pGT26	5/ 601-605	ADN inyectado	MFP 100 µl de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
7 pGT26	5/ 701-705	ADN inyectado	MFP 100 µl de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
8 no inyectado	5/ 801-805		aceite de sésamo 100 µl	extracción de sangre por la cola	extracción de sangre por la cola
9 no inyectado	5/ pool			extracción de sangre terminal	

\*n=número de animales

**Tabla 16: Ciclo 2:** Mismas concentraciones de MFP que las del Ciclo 1

Grupo/ Plásmido	n*/ nº de ratón	día 35-38	día 39
1 pGT26	5/ 101-105	aceite de sésamo 100 µl	extracción de sangre por la cola
2 pGT26	5/ 201-205	MFP 100 µl de 0,00083 mg/ml = 0,0033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
3 pGT26	5/ 301-305	MFP 100 µl de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola
4 pGT26	5/ 401-405	MFP 100 µl de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
5 pGT26	5/ 501-505	MFP 100 µl de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola
6 pGT26	5/ 601-605	MFP 100 µl de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
7 pGT26	5/ 701-705	MFP 100 µl de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola
8 no inyectado	5/ 801-805	aceite de sésamo 100 µl	extracción de sangre por la cola

5

**Tabla 17: Ciclo 3:** Las mismas concentraciones de MFP que las de los Ciclos 1 y 2

Grupo/ plásmido	n*/ nº de ratón	día 63-66	día 67
1 pGT26	5/ 101-105	aceite de sésamo 100 µl	extracción de sangre por la cola
2 pGT26	5/ 201-205	MFP 100 µl de 0,00083 mg/ml = 0,0033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
3 pGT26	5/ 301-305	MFP 100 µl de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola
4 pGT26	5/ 401-405	MFP 100 µl de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
5 pGT26	5/ 501-505	MFP 100 µl de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola
6 pGT26	5/ 601-605	MFP 100 µl de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
7 pGT26	5/ 701-705	MFP 100 µl de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola
8 no inyectado	5/ 801-805	aceite de sésamo 100 µl	extracción de sangre por la cola

\*n=número de animales

**Reinyección de ADN el día 77**

Cada ratón recibió 250 µg de ADN plasmídico en 150 ul de PBS.

**Tabla 18**

Grupo	plásmido	n*
2-8	pGT26	35
*n=número de animales		

- 5 **Tabla 19: Ciclo 4** Las mismas concentraciones de MFP que las de los Ciclos 1-3 para los Grupos 2-7. Los grupos de control (1 y 8) se trataron con 0,33 mg/kg de MFP.

Grupo	Día 0/Día 77 pGT26	n*/ nº de ratón	día 84-87	día 88
1	+/-	5/ 101-105	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
2	+/+	5/ 201-205	MFP 100 ul de 0,00083 mg/ml = 0,0033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
3	+/+	5/ 301-305	MFP 100 ul de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola
4	+/+	5/ 401-405	MFP 100 ul de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
5	+/+	5/ 501-505	MFP 100 ul de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola
6	+/+	5/ 601-605	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
7	+/+	5/ 701-705	MFP 100 ul de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola
8	-/+	5/ 801-805	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola

- Tabla 20: Ciclo 5** Las mismas concentraciones de MFP que las de los Ciclos 1-5 para los Grupos 2-7. Los grupos de control (1 y 8) se trataron con 0,33 mg/kg de MFP.

Grupo	Día 0/Día 77 pGT26	n*/ nº de ratón	día 98-101	día 102
1	+/-	5/ 101-105	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
2	+/+	5/ 201-205	MFP 100 ul de 0,00083 mg/ml = 0,0033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
3	+/+	5/ 301-305	MFP 100 ul de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola
4	+/+	5/ 401-405	MFP 100 ul de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
5	+/+	5/ 501-505	MFP 100 ul de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola
6	+/+	5/ 601-605	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
7	+/+	5/ 701-705	MFP 100 ul de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola
8	-/+	5/ 801-805	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola

**Tabla 21: Ciclo 6** Los mismos tratamientos de MFP que los del Ciclo 5. **Reinyección de ADN el día 189:** Cada ratón recibió 250 ug de ADN plasmídico en 150 ul de PBS. El grupo 9 fueron nuevos ratones de control, que tenían casi la misma edad. Al grupo 1 también se le inyectó el plásmido.

Grupo	Día 0/Día 77 pGT26	n*/ n° de ratón	día 133-136	día 137
1	+/-	5/ 101-105	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
2	+/+	5/ 201-205	MFP 100 ul de 0,00083 mg/ml = 0,0033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
3	+/+	5/ 301-305	MFP 100 ul de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola
4	+/+	5/ 401-405	MFP 100 ul de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
5	+/+	5/ 501-505	MFP 100 ul de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola
6	+/+	5/ 601-605	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
7	+/+	5/ 701-705	MFP 100 ul de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola
8	-/+	5/ 801-805	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola

5

**Tabla 22**

Grupo	Plásmido	n*
3-9	pGT26	35

**Tabla 23: Ciclo 7** Mismas concentraciones de MFP que las de los Ciclos 4-6 para los Grupos 3-7. Los grupos de control (1, 2, 8 y 9) se trataron con 0,33 mg/kg de MFP.

Grupo	Día 0/77/189 pGT26	n*/ n° de ratón	día 196-199	día 200
1	+/-/+	5/ 101-105	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
2	+/+/-	5/ 201-205	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
3	+/+/+	5/ 301-305	MFP 100 ul de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre por la cola
4	+/+/+	5/ 401-405	MFP 100 ul de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre por la cola
5	+/+/+	5/ 501-505	MFP 100 ul de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre por la cola
6	+/+/+	5/ 601-605	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
7	+/+/+	5/ 701-705	MFP 100 ul de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre por la cola
8	-/+/+	5/ 801-805	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola
9	-/-/+	5/ 901-905	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre por la cola

**Tabla 24: Ciclo 8** Mismas concentraciones de MFP que en las del Ciclo 7. A los grupos 3-7 se les extrajo sangre de manera terminal y el ARN y ADN se preparó a partir del músculo.

Grupo	Día 0/77/189 pGT26	n*/ nº de ratón	día 224-227	día 228
3	+ / + / +	5/ 301-305	MFP 100 ul de 0,0025 mg/ml = 0,01 mg/kg	extracción de sangre terminal y músculos
4	+ / + / +	5/ 401-405	MFP 100 ul de 0,0083 mg/ml = 0,033 mg/kg	extracción de sangre terminal y músculos
5	+ / + / +	5/ 501-505	MFP 100 ul de 0,025 mg/ml = 0,1 mg/kg	extracción de sangre terminal y músculos
6	+ / + / +	5/ 601-605	MFP 100 ul de 0,083 mg/ml = 0,33 mg/kg	extracción de sangre terminal y músculos
7	+ / + / +	5/ 701-705	MFP 100 ul de 0,25 mg/ml = 1,0 mg/kg	extracción de sangre terminal y músculos

\*n=número de animales

**Procedimiento de Extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final:** A los ratones se les extrajo sangre por un corte en la cola o punción cardiaca y la sangre se recogió en tubos Microtainer (sin anticoagulante). El suero se preparó después a partir de la sangre recogida y se analizó para determinar IP-10 por ELISA.

**ii. Determinación de cinética de inducción y desinducción de hIFN a partir del vector BRES-1 AAV *in vivo*:** Se realizó un estudio en ratones C57Bl/6 sin tratar usando el vector hIFN-β BRES-1 AAV, AAV-1GT58 para examinar la cinética de inducción y desinducción. Se inyectó AAV-1GT58 en los músculos de las patas traseras de ratones C57Bl/6, a los animales se les administró MFP por inyección i.p. durante cuatro días consecutivos tiempo durante el cual se les extrajo sangre a diferentes tiempos después de la primera inyección con MFP para determinar la cinética de inducción. Después se les extrajo sangre a diversos tiempos después de la última inyección con MFP para determinar la cinética de desinducción (véase “Diseño Experimental” a continuación para detalles). El suero se ensayó para detectar el hIFN por ELISA. Los resultados muestran que la cinética de inducción y desinducción es rápida, con niveles máximos alcanzados de hIFN durante 48-72 horas después de primer tratamiento con MFP (Figura 37A) y disminuyendo a los niveles de fondo a las 96 h después de tratamiento con MFP (Figura 37B). Esto demuestra que el sistema BRES-1 puede activarse y desactivarse *in vivo*.

**A. Diseño Experimental:** A ratones macho C57Bl/6 adultos normales se les inyectó un vector AAV1 que contenía el casete de expresión BRES-1/hIFN de la siguiente manera. Para cada grupo, se sacrificaron cinco animales (n=5) en los “Momentos de Recogida” en la siguiente Tabla a continuación. La expresión de IFN humano se determinó en suero por ELISA en ausencia de MFP o después de administración sencilla/múltiple de MFP.

**Tabla 25**

Grupo	N*	Vector	Tratamiento (MFP)	Tiempo de Recogida
1	10	PBS	Ninguno	24, 96 horas (postinyección)
2	30	MR-hIFN AAV1	Ninguno	7, 14, 21, 28, 35, 42 días (postinyección)
3	25	MR-hIFN AAV1	Solo día 17	1, 3, 6, 12, 24 horas (post administración de MFP)
4	5	MR-hIFN AAV1	Días 16, 17	24 horas (postadministración de MFP)
5	5	MR-hIFN AAV1	Días 15, 16, 17	24 horas (postadministración de MFP)
6	35	MR-hIFN AAV1	Días 18, 19, 20, 21	6, 12, 24, 36, 48, 72, 96 horas (postadministración de MFP)

**Soluciones y transferencia de virus:** Los ratones del grupo 1 recibieron 75 ul de PBS y los ratones de los grupos 2-6 recibieron  $5 \times 10^{10}$  partículas virales (pv) por ratón en un volumen de 75 ul de PBS en una pata trasera (pata derecha). Se inyectaron 25 ul en el músculo tibial y se inyectaron 50 ul en el músculo gastrocnemio.

**Tabla 26**

Grupo	vector	Descripción	n*
1	Ninguno		10
2	AAV-1-GT58	MR-hIFN inv en AAV-1	30
3	AAV-1-GT58	MR-hIFN inv en AAV-1	25



(continuación)

Grupo	vector	Descripción	n*
4	AAV-1-GT58	MR-hIFN inv en AAV-1	5
5	AAV-1-GT58	MR-hIFN inv en AAV-1	5
6	AAV-1-GT58	MR-hIFN inv en AAV-1	35
*n=número de animales			

**Tratamiento con MFP:** A los grupos 3-6 se les administró MFP por inyección i.p. a 0,33 mg/kg (100 ul de 0,083 mg/ml en aceite de sésamo, recién preparado) de acuerdo con el siguiente régimen: Grupo 3 = día 17, Grupo 4 = días 16 + 17, Grupo 5 = días 15-17 y Grupo 6 = días 18-21.

5 **Procedimiento de Extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final:** A los ratones se les extrajo sangre por punción cardíaca (extracción terminal) en los momentos indicados en la Tabla 27. La sangre se recogió en tubos Microtainer (sin anticoagulante) y el suero se separó, se recogió y se ensayó para determinar hIFN por ELISA.

10 **B. Estudios de Persistencia de la Expresión y Administración Repetida:** Los datos generados hasta ahora han demostrado que la expresión usando las construcciones basadas en el promotor del CMV persisten para la IFN- $\beta$  constitutiva al menos 49 días usando el ADN plasmídico y 6 meses usando un vector AAV-1. El plan es repetir y ampliar estos estudios usando el vector candidato con el sistema BRES-1 para demostrar la expresión persistente así como regulable de IFN- $\beta$  durante al menos 3 meses. Estos estudios pueden realizarse en ratones C57/Bl6 sin tratar.

15 Los vectores BRES-1 de la presente invención pueden ensayarse en ratones C57Bl/6 (u otros animales adecuados) para criterios de valoración de biomarcadores repetidos en respuesta a ELISA o administración usando administración de la molécula activadora (MA). La presencia de anticuerpos neutralizantes contra el vector BRES-1, molécula terapéutica expresada (por ejemplo, un transgén), molécula reguladora (MR) o molécula terapéutica pueden supervisarse. Por ejemplo, la molécula activadora (MA) puede administrarse crónicamente así como de una manera pulsátil para evaluar la capacidad de conservar los niveles de expresión de la molécula terapéutica (MT) a lo largo del tiempo así como para proporcionar niveles de expresión renovables de una manera activada/desactivada con una dosificación de MA.

20 En una realización preferida, el vector IFN- $\beta$  BRES-1 de la presente invención puede ensayarse en ratones C57Bl/6 (u otros animal adecuados) para criterios de valoración de biomarcadores repetidos en respuesta a administración de MFP o de IFN- $\beta$ . La presencia de anticuerpos neutralizantes contra el vector, molécula IFN (IFNM) (por ejemplo, un transgén de IFN- $\beta$ ), molécula reguladora (MR) o proteína IFN- $\beta$ , pueden supervisarse. La MFP puede administrarse crónicamente así como de una manera pulsátil para evaluar la capacidad de conservar los niveles de expresión de IFN- $\beta$  a lo largo del tiempo así como para proporcionar niveles de expresión renovables en una manera activada/desactivada con dosificación con MFP.

25 **i. Cinética de la inducción y desinducción de mIFN del plásmido BRES-1, tratamiento pulsátil y crónico con MFP:** Se realizó un estudio en ratones C57Bl/6 sin tratar usando pGT26 para examinar la cinética de inducción y desinducción con el vector plasmídico mIFN- $\beta$  BRES-1, comparar la expresión del gen mIFN en respuesta a la administración pulsátil o crónica de MFP y examinar la persistencia de la expresión génica a lo largo de varios meses. Los plásmidos de expresión mIFN constitutivos (pGER101, CMV) o inducibles (pGT26, BRES-1) se inyectaron con electroporación en los músculos de las patas traseras de 20 ratones por grupo y a cinco ratones de cada grupo se les extrajo sangre el día 7 en ausencia de MFP. Los 20 ratones que recibieron pGT26 se trataron con MFP el día 7-10 después de la inyección con el plásmido. Para examinar la cinética de desinducción, se extrajo sangre de 5 ratones de cada grupo cada uno de los días 11, 12, 14, 16 y 18 después de la inyección. Todos los ratones tratados con pGT26 recibieron después MFP los días 21-24 y para examinar la cinética de inducción, se extrajo sangre de cinco ratones de cada grupo en cada uno de los días 22, 23 y 25. (Véase "Diseño Experimental" a continuación para detalles). Para examinar la expresión génica diana en respuesta a tratamiento continuo con MFP, a los ratones que recibieron pGT26 se les inyectó MFP i.p. cada día a partir del día 35-50 y a cinco ratones de cada grupo se les extrajo sangre durante este periodo el día 35 (antes del tratamiento con MFP), 39, 42, 45 y 51. Para examinar la expresión génica después de 3,5 meses, a los ratones se les extrajo sangre el día 105, después se trataron con MFP los días 105-108 y después se les extrajo sangre el día 109 y 116. Las muestras de suero se ensayaron para IP-10 como un biomarcador para la expresión de mIFN.

30 Los resultados (Figura 37C) demuestran que la inducción de la expresión de IFN a partir del plásmido BRES-1 después del tratamiento con MFP se produce a las 24 h y la expresión disminuye a la línea basal 24-48 h después de la inducción máxima. La expresión de mIFN del sistema BRES-1 fue mayor que cuando se conducía por el promotor de CMV. Los tres ciclos de expresión de mIFN a lo largo de la duración de los dos a tres meses fueron a altos niveles. El tratamiento continuo con MFP dio como resultado una expresión prolongada de nivel elevado de mIFN durante dos semanas. Los niveles de IP-10 después de 3,5 meses fueron aproximadamente la mitad a dos

5 tercios menor que en los ciclos previos con MFP, pero aún estaban bastante por encima de los niveles de fondo de IP-10 y también considerablemente mayores que los generados por la expresión de mIFN a partir del promotor del CMV, que también disminuyó a lo largo del tiempo con aproximadamente la misma cinética (dos tercios de expresión menos después de 3,5 meses). En total, este experimento demuestra la capacidad del sistema BRES-1 para una expresión génica diana continua de alto nivel durante varios meses con la capacidad de desactivarse y activarse rápidamente de nuevo múltiples veces.

10 **Diseño Experimental:** A ratones C57Bl/6 normales se les inyectó y electroporó con los plásmidos de expresión de IFN de ratón del promotor CMV y BRES-1 de un solo vector de la siguiente manera. La expresión de IFN se supervisó durante al menos varios meses usando IP-10 como el biomarcador de punto final para detectar la actividad de mIFN. El tratamiento con MFP y las extracciones de sangre se diseñaron para determinar la cinética de las respuestas “activas” e “inactivas”.

**Soluciones de ADN:** Cada ratón en todos los grupos inyectados recibió 250 ug de ADN plasmídico en 150 ul de PBS.

Tabla 27

Grupo	plásmido	Descripción	n*
1	pGER101	CMV-mIFN	10
2	pGT26	BRES-1/mIFN	20
*n=número de animales			

15 **Transferencia de ADN:** A ratones C57Bl/6 adultos se les inyectó bilateralmente el día 0 ADN plasmídico 250 ug por ratón en 150 ul de PBS. Se inyectaron 25 ul de solución de ADN en músculo tibial y se inyectaron 50 ul en el músculo gastrocnemio de cada pata trasera seguido por electroporación con un calibrador (8 impulsos a 200 V/cm, 1 Hz, 20 ms/impulso).

20 **Tratamiento con MFP:** Al grupo 2 se le administró MFP por inyección i.p. a 0,33 mg/kg (100 ul de 0,083 mg/ml en aceite de sésamo, recién preparado) como se indica en la siguiente tabla a continuación.

**Régimen:** Ciclo 1 (día 7-18): Determina la cinética “inactivada”. Ciclo 2 (día 21-25): Determina la cinética “activada”.

Tabla 28 Ciclo 1

Grupo/ plásmido	n*/ n° de ratón	día 0	día 7	día 7-10	día 11	día 12
1 CMV-mIFN	10 101-110	ADN inyectado	extracción de sangre por la cola A (101-105)		extracción de sangre por la cola B (106-110)	
2 BRES1-mIFN	20 201-220	ADN inyectado	extracción de sangre por la cola A (201-205)	MFP A-D (201- 220)	extracción de sangre por la cola B (206-210)	extracción de sangre por la cola C (211-215)
*n=número de animales						

Tabla 29 Ciclo 2

Grupo/ plásmido	día 14	día 16	día 18	día 21-24	día 22	día 23	día 25
1 CMV-mIFN	extracción de sangre por la cola A		extracción de sangre por la cola B		extracción de sangre por la cola A		extracción de sangre por la cola B
2 BRES1-mIFN	extracción de sangre por la cola D (216-220)	extracción de sangre por la cola A	extracción de sangre por la cola B	MFP A-D	extracción de sangre por la cola C	extracción de sangre por la cola D	extracción de sangre por la cola A

25

Tabla 30: Ciclo 3 Tratamiento con MFP continuo

Grupo/ plásmido	día 35	día 35-50	día 39	día 42	día 45	día 51
1 CMV-mIFN	extracción de sangre por la cola B		extracción de sangre por la cola A		extracción de sangre por la cola B	extracción de sangre terminal y músculos A
2 BRES1-mIFN	extracción de sangre por la cola A	MFP A-D	extracción de sangre por la cola B	extracción de sangre por la cola C	extracción de sangre por la cola D	extracción de sangre terminal y músculos A

**Procedimiento de Extracción de Sangre y Análisis/Ensayo de Punto Final:** A los ratones se les extrajo sangre por un corte en la cola o punción cardiaca (extracción de sangre terminal) en los momentos indicados en la tabla anterior. La sangre se recogió en tubos Microtainer (sin anticoagulante) y se centrifugó para la separación y recogida del suero. El suero de los grupos 1 y 2 se ensayó para detectar IP-10 por ELISA.

**C. Estudios de Bioequivalencia:** Se realizaron estudios farmacocinéticos en ratones normales y en las otras especies, preferentemente primates no humanos usando el vector candidato del sistema de expresión BRES-1 en condiciones de administración, por ejemplo, como se establece en los estudios descritos anteriormente. La "bioequivalencia" puede ser, pero sin limitación, por ejemplo, para demostrar que el sistema de expresión regulado presente de la presente invención proporciona un perfil farmacocinético superior para la transferencia basada en genes de IFN- $\beta$  sobre la transferencia de proteína IFN- $\beta$  en ambos modelos animales como se define, pero sin limitación, por ejemplo, en la siguiente tabla.

Tabla 31: Ejemplos No Limitantes de Criterios de Bioequivalencia

Criterios	Criterio de Valoración
Administración	Clínicamente factible para transferencia de MI
Nivel de Expresión	Igual o mayor que *nivel terapéutico conseguido con proteína en embolada
Persistencia de Expresión	Más de 3 meses
Administración Repetida	Expresión renovable después de administración repetida de vector e inductor
Expresión Continua/Pulsátil	Dosis de MFP óptima necesaria para conseguir y mantener *nivel terapéutico a lo largo del tiempo; renovable con dosificación con MFP.
*En una realización no limitante, el "nivel terapéutico" en un modelo animal se define como el nivel sistémico de IFN- $\beta$ (como se determina, por ejemplo, mediante ELISA y/o inducción con biomarcador) que es equivalente al nivel conseguido mediante una cantidad terapéutica de IFN- $\beta$ 1 en embolada, una proteína administrada en seres humanos en una base mg/kg.	

**D. Estudios de Seguridad/Toxicidad:** Si como vector candidato se selecciona AAV-1 pueden realizarse estudios de biodistribución después de administración i.m. del vector candidato. Los criterios de valoración incluirán ADN vectorial y ARN de IFN- $\beta$  expresado y la distribución de proteína a tejido diana (músculo), sangre, linfa, corazón, hígado, riñón, pulmones, gónadas masculinas y femeninas (testículos, ovario).

**E. Transmisión Basada en Genes para el Tratamiento de una Enfermedad o Afección:** Un resultado de estos estudios es un sistema de transferencia basado en genes para la transferencia de una molécula terapéutica (MT), por ejemplo un transgén que codifica una proteína terapéutica, para el tratamiento de una enfermedad o afección. En una realización preferida, la presente invención proporciona un sistema de transferencia de expresión regulado de un transgén de IFN- $\beta$  que proporcionará expresión regulada prolongada de IFN- $\beta$  para el tratamiento de EM. En una realización preferida, un resultado de estos estudios es que el vector BRES-1 de la presente invención puede proporcionar una expresión renovable, persistente (por ejemplo mayor de 3 meses) mediante administración oral del inductor de pequeña molécula, MFP; y puede repetirse la administración mediante inyección intramuscular.

**i. Caracterización de la actividad del plásmido BRES-1 mIFN en ratones con enfermedad EAE:** Para demostrar un efecto biológico en un modelo de enfermedad animal de EM, se realizó un estudio en ratones SJL con EAE activa. Los plásmidos de expresión de mIFN constitutivos (pGER101, pmIFN) o inducibles (pGT26, pBRES-1/mIFN) y controles de plásmidos nulos se inyectaron con electroporación en los músculos de las patas traseras de ratones SJL. Se indujo la EAE en los ratones mediante inyección de PLP 139-151/toxina tosferínica el día anterior y después de inyección de pmIFN, y 7 y 9 días después de la inyección de pBRES-1/mIFN. Los ratones se trataron con MFP (0,33 mg/kg) mediante inyección i.p. una vez al día (d) o una vez cada tres días (ctd) después de una inyección con el plásmido. Se extrajo la sangre el día 5 después de la inyección. Se aislaron CMSP de la sangre y se preparó ARN a partir de y se ensayó por RT-PCR para determinar el nivel de ARN Mx1 (Véase "Diseño Experimental" más adelante para detalles). Los resultados muestran aproximadamente un aumento de 8 veces en los niveles de ARN de Mx1 con pBRES-1/mIFN más inyecciones diarias de MFP y no hubo aumento significativo sobre un vector nulo

en ausencia de MFP (Figura 38). Esto demuestra una respuesta biológica en un modelo de enfermedad animal similar a la que se ha observado que es eficaz en este modelo.

**Diseño Experimental:** Se distribuyeron ratones SJL hembra (de 8 semanas de vida, Jackson Labs, -20 g) en 12 grupos (n=13 por grupo), y a cada grupo se le inyectó los Días 1 y 3 PLP 139-151/toxina tosferínica, de acuerdo con el protocolo EAE murino A de la siguiente manera.

5

**Grupo 1,** No tratados. Control sin tratamiento.

**Grupos 2-3,** plásmido CMV más Electroporación (EP): Dos inyecciones intramusculares (im) bilaterales de bien ADN plasmídico Nulo (pgWiz) o de CMV del mIFN (pGER101) en los músculos de la tibia (20 ul) y gastrocnemio (40 ul), seguido inmediatamente por EP el Día 2, según se administra.

10 **Grupos 4-9,** Plásmido BRES1 más EP: Se administraron dos inyecciones intramusculares (im) bilaterales de ADN plasmídico de BRES-1 Nulo (pGT4) o BRES-1 mIFN (pGT26) en los músculos tibial (20 ul) y gastrocnemio (40 ul), seguido por EP una semana (Día -7) antes del inicio de la enfermedad. La MFP (0,33 mg/kg) se administró diariamente o cada tres días (ctd) por inyección ip comenzando el Día 1. Los animales que recibieron MFP (ctd) se dosificaron los días 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 y 22.

15 **Grupos 10-11,** proteína mIFN, Control con Tampón: el tampón con proteína IFN o proteína mIFN (100.000 unidades = 500 ng) se administró cada dos días por inyección sc, comenzando el Día 1.

**Group 12,** Prednisolona: La prednisolona se administró diariamente cada dos días por inyección intraperitoneal (ip), comenzando el Día 1.

Tabla 32

Grupo	Nº de ratón	Agente	Dosis	Volumen/dosis
1. No tratado	13	Ninguno	-----	-----
2. pNull/EP	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
3. pmIFN/EP	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
4. pBRES-1 Null/EP (-MFP)	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
5. pBRES-1 Null/EP (+MFP cada día)	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
6. pBRES-1 Null/EP (+MFP ctd)	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
7. p pBRES-1 mIFN/EP (-MFP)	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
8. pBRES-1 mIFN/EP (+MFP cada día)	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
9. pBRES-1 mIFN/EP (+MFP ctd)	13	plásmido	2 x 60 ug	2 x 60 ul im
10. Control con tampón	10	tampón	-----	100 ul/inj.* sc
11. proteína mIFN	10	proteína	100.000 U/inj.*	100 ul/inj.* sc
12. Prednisolona	10	compuesto	2,5 mg/kg/inj.*	100 ul/inj.* ip

\*iny.=inyección

20

Tabla 33

Grupo	plásmido	Día de inyección	ADN (mg)	mg/ml	ml	PBS (ml)	volumen total (ml)
2	pNull (pgWiz)	2	1,8	5,32	0,34	1,46	1,8
3	pmIFN (pgWiz/mIFN) (pGER101)	2	1,8	5,36	0,34	1,46	1,8
4, 5, 6	pBRES-1 Null (pGT4)	-7	1,8 x 3 = 5,4	6,35	0,85	4,55	1,8x3= 5,4
7, 8, 9	pBRES-1 mIFN (pGT26)	-7	1,8 x 3 = 5,4	5,28	1,02	4,38	1,8x3= 5,4

**Grupo 11** proteína mIFN: 100.000 unidades (500 ng) /100 ul iny. x 13 animales x 15 inyecciones =  $1,95 \times 10^7$  unidades (97,5 ug)/19,5 ml. Solución madre de mIFN = 100 µg/ml o  $2 \times 10^7$  unidades/ml. Los tubos de dilución contenían 100 ul x 15 animales = 1,5 ml (se preparó un total de 15 tubos de dilución que contenían NaCl 150 mM, acetato sódico 50 mM, pH 5, propilenglicol al 5 %). Se añadirán 75 µl de solución madre a cada tubo. Concentración

25

final =  $10^6$  unidades/ml.

**Análisis de Valoración Final (análisis de ARN de Mx1):** Tres animales de los grupos 1-9 se sacrificaron el Día 5 y se extrajo sangre de modo terminal para análisis de ARN Mx1 (usando tubos púrpura que contenían EDTA) y los músculos inyectados se recogieron para análisis de ARN de IFN.

5 **F. Producción:** El proceso de producción de un vector para terapia génica de la presente invención que comprende un casete de expresión pBRES-1 hIFN- $\beta$  puede ser adecuado para la preparación de GMPc. Usando procedimientos descritos en el presente documento conocidos en la técnica, los vectores BRES-1 de la presente invención pueden prepararse con una suficiente pureza, fuerza y estabilidad para realizar estudios de desarrollo preclínicos. Los  
10 vectores de terapia génica de la presente invención y preferentemente los vectores BRES-1 de la presente invención, pueden caracterizarse completamente con respecto a la estructura del plásmido, cápside (en el caso de AAV como un vector de transferencia), producto de expresión de transgén (IFN- $\beta$ ) e inductor (MFP), usando procedimientos descritos en el presente documento conocidos en la técnica.

15 **G. Farmacología:** La bioequivalencia con la transferencia de proteína puede demostrarse en un modelo animal. La dosis/respuesta para vector e inductor o molécula activadora (MA) (por ejemplo, inductor de pequeña molécula MFP) puede caracterizarse y optimizarse *in vivo*. La administración repetida y persistencia de la expresión del transgén puede caracterizarse completamente. Pueden realizarse estudios de inmunogenicidad con el vector candidato.

20 **H. Farmacocinética/seguridad/toxicología:** Pudieron realizarse estudios farmacocinéticos del transgén IFN- $\beta$  expresado usando detección directa del transgén expresado así como medición de biomarcadores IFN- $\beta$ . Si el vector candidato seleccionado es AAV-1, pueden realizarse estudios de biodistribución para examinar el destino del ADN vectorial y sus productos de expresión.

#### **Ejemplo 10: Identificación de nuevas moléculas activadoras (MA) para el sistema de expresión regulado.**

##### **A. Desarrollo del complejo de LBD MA-MR**

25 Se identificaron nuevos análogos de ligando de RP funcionalmente selectivos para el sistema de expresión regulado de la presente invención combinando datos de exploración de los compuestos con modificación por ingeniería genética de proteínas para desarrollar un complejo LBD MA-MR único. Los compuestos esteroideos similares a  
30 antiprogestina exclusivos, muchos de los cuales comparten una similitud estructural significativa con MFP, se identificaron y ensayaron usando el ensayo de exploración de luciferasa basado en pBRES. Los datos de relación de estructura-actividad (SAR) derivados de esta exploración directa se usaron para identificar compuestos que no activaban el sistema de expresión pBRES, supuestamente debidos a conflictos estéricos o electrónicos entre el  
35 compuesto y los aminoácidos que revisten el bolsillo de unión a ligando (LBP) dentro del LBD de la MR. Los compuestos así identificados se exploraron adicionalmente en un ensayo secundario basado en células TD47D para confirmar que los compuestos inactivos a pBRES también carecían de actividad anti-RP. Comenzando con estos compuestos candidatos inactivos se desarrolló un complejo MA-MR funcionalmente selectivo, es decir ortogonal con respecto a otras dianas fisiológicas, usando una estrategia de modificación por ingeniería genética de LBD guiada por modelado para reestablecer la activación de pBRES.

40 Dado que no había datos estructurales para la interacción entre los compuestos similares a MFP y el LBD derivado de hPR, para comprender mejor la base molecular de la interacción entre LBD de MR y los compuestos ensayados en la exploración directa, se desarrolló un modelo de homología para el complejo LBD MFP-RM basado en estructura cristalina por rayos X del RG formando complejo con MFP (Kauppi B. y col. (2003) J. Biol. Chem. 278:  
22748-22754). Los compuestos inactivos identificados en la exploración directa se relacionaron en el modelo de LBP MR y los conflictos entre cada compuesto y los restos de LBD identificados. Se modeló una serie de mutaciones dirigidas a aliviar los conflictos y se instaló en el LBP de la MR.

45 La capacidad de los compuestos candidatos para activar el sistema de expresión pBRES modificado por ingeniería genética se midió en el ensayo de luciferasa basado en pBRES. Las mutaciones que mejoran la interacción entre los compuestos previamente inactivos y el LBD de MR modificado se acoplaron en el modelo y se usaron para proponer mutaciones adicionales diseñadas para ajustarse mejor al bolsillo de unión de la nueva MA. A través de dos iteraciones de la mutagénesis y ensayo en ciclos de ensayo basados en células, se identificó un mutante de LBD MR que es 39 veces más activo en respuesta al nuevo BLX-913 MA que la MR original. Estos estudios demuestran la aplicabilidad clínica de la plataforma pBRES.

##### **B. Ensayo de Análogos de Ligandos de RP**

50 Se identificaron 115 compuestos esteroideos con características estructurales similares a la antiprogestina. En particular, los compuestos que mostraron similitud estructural con la progesterona (por ejemplo véase Figura 43D) y estructura similar a la antiprogestina (por ejemplo véase Figura 43A-C), y contenían un sustituyente voluminoso en la posición 11 $\beta$ , se ensayaron para detectar su capacidad para activar pBRES en la línea celular MCF10A humana,  
55 que expresaba establemente las construcciones pBRES, utilizando un gen indicador de luciferasa (Luc) de luciérnaga en lugar de una MT. La capacidad de los compuestos de ensayo para estimular la expresión de Luc se comparó con la de MFP a 25 nM. Los compuestos que no activaron la expresión de luciferasa se examinaron y

clasificaron en 3 clases generales de compuestos: 1) los que no cumplen los requisitos para la estructura de antiprogestina, que es necesaria para la activación eficaz de la MR; 2) los que presentaron cambios estructurales drásticos que requerirían una mutagénesis del bolsillo de unión amplia más allá del ámbito de este estudio; 3) los que presentaron cambios estructurales conservativos y conservaron una similitud estructural significativa (es decir eran análogos estructurales) con respecto a compuestos más fuertes. Se volvieron a ensayar ocho compuestos de la clase 3 en el ensayo pBRES-Luc en células NIH 3T3 transfectadas temporalmente (Figura 41). Adicionalmente estos compuestos se ensayaron en el ensayo basado en células T47D humanas para la actividad anti-RP (Figura 42). El compuesto que presentaba el nivel más bajo de actividad en ambos ensayos se identificó como BLX-913 (Figura 43A).

#### 10 **Diseño experimental: Construcción de la línea celular MCF 10A estable**

Se cultivó la línea celular epitelial mamaria humana MCF 10A (ATCC, N° CRL-10317) en placas de 10 cm. Las células se transfectaron con el plásmido pGT137 (pBRES-Luc, selección con puromicina) usando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche). En resumen, se diluyeron 6 µg de ADN y 36 µg de Fugene 6 en 750 µl de Opti-MEM sin suero. El ADN y el Fugene 6 se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se cultivaron durante 2 días antes de la exploración con 1 µg/ml de puromicina durante 3 semanas. Se seleccionaron clones positivos y se verificaron por ensayo de luciferasa para la expresión y activación de pBRES-Luc.

#### 15 **Determinación de la activación de pBRES por medición de la actividad luciferasa**

Todas las células se recogieron por tripsinización suave, seguido por un lavado con PBS. Después las células se centrifugaron durante 5 min a 800 rpm y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo tisular. Después las células se sembraron a una densidad celular de  $1 \times 10^4$  células/pocillo (volumen de 100 µl/pocillo) en una placa de cultivo tisular negra de fondo plano de 96 pocillos en condiciones estériles. Posteriormente las células se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. Después de esto, en condiciones estériles, los medios se retiraron por aspiración cuidadosa y los pocillos se sustituyeron con 95 µl de medio recién preparado, seguido por la adición de 5 µl/pocillo de compuesto apropiadamente diluido o tampón de control, dando como resultado concentraciones de compuesto final que variaban de 0,00064 a 50 nM (en DMSO final al 0,05 %). Después las placas de cultivo celular se taparon y se incubaron durante 24 h en una incubadora a 37 °C. Después de esto, se retiraron los medios de las placas por suave aspiración, las placas se secaron por transferencia y las células se lisaron con 50 µl/pocillo de reactivo de sustrato de ensayo de luciferasa del Kit del Sistema de Ensayo de Luciferasa (Promega, Inc). Después las placas se agitaron suavemente durante 1 minuto después de la adición de su reactivo de sustrato luciferasa y la actividad enzimática de la luciferasa se midió posteriormente a diversos tiempos (5 minutos, 30 minutos, 60 minutos), usando un Lector de Placa Luminiscente Microbeta (PerkinElmer) usando un protocolo de lectura de luciferasa normalizado.

#### 20 **C. BLX-913**

El compuesto BLX-913 mostró una similitud significativa con un candidato de desarrollo clínico avanzado Asoprisnil (Figura 43B). Para comparar también se muestra la MFP más fuerte de MA pBRES (Figura 43C). La actividad antiprogestina de MFP y BLX-913 se presenta en la Figura 44 y revela que BLX-913 es una antiprogestina 30 veces menos fuerte que MFP. La similitud sustancial entre BLX-913 y Asoprisnil sugiere que los amplios datos de seguridad, dosificación y PK/PD ya acumulados para Asoprisnil durante su desarrollo clínico tendrían paralelismos directos con respecto a las propiedades del compuesto BLX-913. La existencia de un análogo parecido en estados clínicos avanzados añadido al valor del compuesto BLX-913 es una MA pBRES nueva potencial.

#### 25 **D. Construcción del Modelo de Homología**

Para identificar los conflictos entre los restos del compuesto BLS-913 y los aminoácidos dentro del LBP de MR que eran responsables de la incapacidad del compuesto para estimular el sistema de expresión pBRES, se construyó un modelo de homología del LBD de MR con BLX-913. Dado que no había una estructura disponible de la MR o su LBD-hPR parental con ninguna antiprogestina esteroidea, el modelo de LBD MR unido a MFP se construyó primero (Figura 45), basándose en la estructura cristalina de rayos X de LBD de RG unido a MFP. Los LBD de MR y RG compartían una identidad del 44 % y una similitud del 68 % en la secuencia de aminoácidos, por tanto el modelo resultante mostró un bajo nivel de cepa conformacional en las cadena laterales de LBD y una Desviación Cuadrática Media (RMSD) de los aminoácidos de LBD conservados entre el modelo de MR y la estructura de RG parental fue menor de 0,1 Angstrom. El ligando de MFP se reemplazó con el compuesto BLX-913 en el bolsillo de unión del modelo de LBD de MR. Se observó un triptófano en la posición 755 (numeración de hPR) en conflicto con el resto β-benzaldoximina del BLX-913 (Figura 46) y se inició mutagénesis para aliviar este conflicto.

#### 30 **E. Evaluación del Efecto de Mutaciones Dirigidas sobre la Medición de la Actividad Luciferasa**

Se instaló un panel de mutaciones en la posición 755 y las construcciones pBRES resultantes se evaluaron en el ensayo de luciferasa en células HEK 293 transfectadas temporalmente. La proteína MR que alojaba la mutación W755A mostró aproximadamente una activación 4 veces mejorada en respuesta a BLX-913 en comparación con la proteína MR original (Figura 47). Se construyó la interfaz mejorada entre LBP MR W755A y BLX-913 dentro del

modelo de homología y se examinó estrechamente para hallar pistas para mejorar adicionalmente la interacción con mutaciones adicionales. Se instalaron mutaciones de segundo ciclo para amoldar mejor el LBP a la nueva MA para mejorar adicionalmente la actividad del complejo MR-BLS-913 modificado por ingeniería genética. La construcción de MR contenía la doble mutación V729L/W755A, pGT1017, mostró una actividad 39 veces mejorada en presencia de BLX-913 en comparación con la proteína MR original (Figura 48). La respuesta del mutante MR V729L/W755A en dosis en aumento de BLX-913 se comparó con el mutante MR W755A de primera ronda pGT1009 y la construcción wt-pBRES pGT79 y se confirmó que el mutante doble V729L/W755A representa una mejora sobre las proteínas de la construcción pBRES original que no se debía a un aumento en el nivel de proteína (Figura 49). Para verificar que la actividad mejorada vista con las proteínas MR mutantes no se debía a un aumento de los niveles de proteínas, los lisados de células HEK 293 de las transfecciones transitorias (wt-pBRES pGT79, W755A RM pGT1009 o V729L/W755 RM pGT1017) se resolvieron en SDS-PAGE y se visualizaron sobre transferencias Western usando un anticuerpo contra el DA p65 (Santa Cruz, sc-372) (Figura 50). Las mutaciones LBD no afectaron a los niveles de la proteína MR dentro de las células y por tanto la activación mejorada en respuesta a BLX-913 no se debió más probablemente a una interacción mejorada entre el ligando y el LBD.

#### 15 **Diseño Experimental: Ensayo de Luciferasa pBRES primario en células HEK 293**

Para determinar los efectos de los compuestos de ensayo sobre la actividad pBRES en células 293 Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) (ATCC N° CRL-1573), se sembraron células en placa en discos de 60 mm a  $5 \times 10^5$  células/disco en 5 ml de MEM alfa con L-glutamina 4 mM y FBS inactivado por calor al 10 %. Las células se transfectaron 24 horas después con construcciones pBRES usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a una proporción de 1:2,5 de ADN ( $\mu\text{g}$ ):reactivo Lipofectamine 2000 ( $\mu\text{l}$ ). El medio que contenía complejos lipídicos se retiró después de 4 horas y se permitió que las células se recuperasen en medio de cultivo recién preparado durante 24 horas. Las células se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo en medio de cultivo. Al día siguiente las células se trataron con MFP o compuesto de ensayo usando el mismo medio. Los compuestos se disolvieron en vehículo con etanol al 100 % y se diluyeron usando el medio de tratamiento. La concentración final de etanol en el medio de tratamiento fue de 0,1 %. Cada tratamiento consistió en tres copias. Veinticuatro horas después del tratamiento, se midió la actividad luciferasa de la siguiente manera: el medio se retiró y las células se lavaron una vez con PBS de Dulbecco. Las células se lisaron con 20  $\mu\text{l}$ /pocillo de 1x Tampón de Lisis Pasivo (PLB, Promega) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación en un agitador de placa de titulación. Las placas se congelaron a -80 °C durante 20 minutos y se descongelaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación en un agitador de placa de titulación. La actividad luciferasa se midió usando el sustrato del Sistema de Ensayo Luciferasa Promega (Cat. N° E1501) (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) usando un luminómetro Berthold MicroLumat Plus.

#### 25 **Ensayo de RP secundario en células T47D**

Para determinar los efectos de los compuestos de ensayo sobre la actividad fosfatasa alcalina inducida por el receptor de Progesterona humano en células T47D de carcinoma de mama humano (ATCC N° HTB-133), las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en medio de cultivo (RPMI1640 con piruvato sódico 1 mM, 0,2 unidades/ml de insulina, L-glutamina 4 mM y FBS al 10 %). Después de una noche de cultivo, el medio se cambió por el medio de ensayo (RPMI1640 (sin rojo fenol) con piruvato sódico 1 mM, 0,2 unidades/ml de insulina, L-glutamina 4 mM y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %). Al día siguiente, las células se trataron con MFP o compuestos de ensayo en presencia de Promegestona 200 pM. Los compuestos se disolvieron en un vehículo con etanol al 100 % y se diluyeron usando el medio de ensayo. La concentración final de etanol en el medio de ensayo fue de 0,2 %. Cada tratamiento consistió de 5 a 6 copias. Veinticuatro horas después del tratamiento, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina celular de la siguiente manera: el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con DPBS. Después se retiró el DPBS residual, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis celular (Tris-HCl 100 mM pH 9,8, Triton X-100 al 0,2 %) a cada pocillo y las placas se congelaron a -80 °C durante 30 minutos. Las placas se descongelaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación sobre un agitador de placa de titulación. Se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de tampón sustrato (Tris-HCl 100 mM pH 9,8, p-nitrofenil fosfato 4 mM). Se tomaron mediciones de absorbancia a intervalos de 5 minutos durante 1 hora en la longitud de onda de ensayo de 405 nm.

#### 35 **Modelo de homología del LBD de MR**

El modelo de homología de LBD de MR basado en el complejo LBD/MFP de RG se creó usando el elemento SwissModel de DeepView Swiss PDB Viewer versión 3.70 (Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997) Electrophoresis 18: 2714-2723. <http://expasy.org/spdbv/>). En resumen, la secuencia de aminoácidos primaria correspondiente a los restos 640-914 del receptor de Progesterona humano (Registro NP\_000917) se adaptó sobre la estructura cristalina de rayos X del receptor Glucocorticoide humano 1 NHZ.pdb y se remitió al servidor Swiss-Prot para minimización. El ajuste del modelo resultante con la estructura cristalina RG/MFP se examinó usando el programa informático Insight2 (Accelrys Software Inc.).

#### 45 **Modelado de interacciones del compuesto MR LBD**

Se crearon modelos de MFP, BLX-913 y otros compuestos de ensayo unidos al bolsillo de unión al ligando de MR usando el Discovery Studio Viewer Pro versión 6.0 (Accelrys Software Inc.) y los restos de sitio activo se

identificaron mediante el rlig\_view script (Dr. Marc Adler, Biophysics Department, Berlex, no publicado).

#### Mutagénesis dirigida

5 Se instalaron mutaciones dirigidas dentro de LBD MR usando la estrategia de mutagénesis Quick Change usando los siguientes cebadores con los codones recientemente instalados subrayados. El esquema de numeración de aminoácidos sigue la numeración de aminoácidos de hPR. Se instalaron mutaciones sencillas en las posiciones 719 y 755 usando el molde pGT79. Se instalaron mutaciones dobles en las posiciones 729 y 726 usando el molde pGT1009 (W755A).

**N719Q (pGT1003) (SEC ID N°: 60)** 5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTG AGC AAC TAG GCG  
AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG CTG AAG ACT TGT CAG CAA AG -3';

**N719A (pGT1004) (SEC ID N°: 62)** 5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTG CCC AAC TAG GCG  
AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG GGC AAG ACT TGT CAG CAA AG -3';

**N719G (pGT1005) (SEC ID N°: 64)** 5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTG GCC AAC TAG GCG  
AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG GCC AAG ACT TGT CAG CAA AG -3';

**W755F (pGT1006) (SEC ID N°: 66)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTT TCA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT GAA AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**W755L (pGT1007) (SEC ID N°: 68)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTC TGA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT CAG AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**W755V (pGT1008) (SEC ID N°: 70)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTG TGA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT CAC AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**W755A (pGT1009) (SEC ID N°: 72)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTG CCA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT GGC AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**V729A/W755A (pGT1015) (SEC ID N°: 74)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC AGC CGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG GCT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3';



**V729G/W755A (pGT1016) (SEC ID N°: 76)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC AGG CGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG CCT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3';

**V729L/W755A (pGT1017) (SEC ID N°: 78)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC ACT GGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACC AGT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3'.

**V729F/W755A (pGT1025) (SEC ID N°: 80)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC ATT CGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG AAT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3';

**L726V/W755A (pGT1020) (SEC ID N°: 82)** 5'- GGC GAG AGG CAA GTG CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG CAC TTG CCT CTC GCC -3';

**L726A/W755A (pGT1021) (SEC ID N°: 84)** 5'- GGC GAG AGG CAA GCC CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG GGC TTG CCT CTC GCC -3';

**L726G/W755A (pGT1022) (SEC ID N°: 86)** 5'- GGC GAG AGG CAA GGG CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG CCC TTG CCT CTC GCC -3';

**L726I/W755A (pGT1023) (SEC ID N°: 88)** 5'- GGC GAG AGG CAA ATC CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG GAT TTG CCT CTC GCC -3';

**L726F/W755A (pGT1024) (SEC ID N°: 90)** 5'- GGC GAG AGG CAA TTC CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG GAA TTG CCT CTC GCC -3';

#### Ejemplo 11: Mutaciones de tercera ronda

5 Cada ronda de mutagénesis y la posterior evaluación en ensayos basados en células contribuyen al entendimiento de SAR entre ligandos MR y los aminoácidos que cubren el bolsillo de unión. Se han instalado mutaciones de tercera ronda que tienen en cuenta los resultados de los mutantes de la primera ronda W755A y segunda ronda V729L/W755A y se diseñaron para modular adicionalmente el LBP MR: V729F/W755A, L726V/W755A, L726A/W755A, L726G/W755A, L726I/W755A y L726F/W755A. Se evalúan contribuciones de mutaciones individuales y, cuando sea apropiado, se combinan en una sola construcción para obtener el mejor par receptor-ligando MR diseñado por ingeniería genética de BLX-913. Dado que simplemente alargar una parte del bolsillo de unión para alojar un compuesto voluminoso no es suficiente para producir un nuevo complejo potente MA-MR, se requiere un moldeado cuidadoso del bolsillo en el ligando para minimizar el espacio no ocupado y por tanto excluir cualquier agua adventicia.

15 Otras mejoras con respecto al complejo MA-MR único pueden conseguirse en combinación con una estrategia de diversificación basada en química para generar análogos de BLX-913. Pueden desarrollarse pares ligando-receptor MA-MR más potentes usando derivados más voluminosos (es decir más selectivos) de BLX-913 en la posición 11. Dado que la orientación y las mutaciones compensatorias necesarias para el resto de aldoxima en la posición 11 del ligando de unión a MR se ha identificado y validado, pueden instalarse grupos de alteración más sustanciales para asegurar una selectividad absoluta contra la RP parental. Pueden incluirse sustituyentes más grandes sobre la MA mediante estrategia de mutagénesis dirigida por modelado para producir una MA altamente selectiva sin efectos fisiológicos no deseados. Adicionalmente, la estrategia de mutagénesis-síntesis química combinada puede producir análogos que tienen la ventaja de introducir de manera natural o sintética redes de enlaces de hidrógeno. Otras regiones de interfaz ligando-MR, junto a la posición 11, también son posibles con respecto a la modificación química y mutagénesis adecuada. Los análogos de MFP existentes con modificaciones en las posiciones 15 y 16 (Figura 13) se han identificado y explorado para la actividad de antiprogestina (Figura 14). Uno de estos compuestos, BLX-899, tiene aproximadamente una actividad anti-RP 5 veces más débil que la MFP en el ensayo basado en células T47D. Este compuesto también se ensayó en el ensayo pBRES-Luc y demostró una inducción 2 veces más débil en comparación con MFP. El compuesto se modeló en el modelo de homología de LBD MR y se identificaron conflictos entre el grupo metilo en la posición 16 y los restos del bolsillo de unión. Cadenas laterales de los aminoácidos Leu 887 y Leu 797 definen la topología de LBP MR en la región donde están las posiciones 15 y 16 de la unión de ligando. Los restos de leucina pueden reducirse a valina, alanina o glicina para alojar la irregularidad estructural sobre BLX-899 para restablecer la activación de pBRES. Cualquier mejora en la estimulación de la construcción pBRES que contiene los mutantes en la posición 887 y/o 797 en respuesta a BLX-899 no es lo suficientemente significativa en sí misma para su uso como un sistema de expresión regulado funcionalmente selectivo, pero impulsaría una estrategia sintética química para incorporar tanto el grupo metilo de la posición 15 como el resto de

11  $\beta$ -benzaldoxima en una sola molécula. Las mutaciones W755A y V729L pueden instalarse junto con las mutaciones en la posición 887 y /o 797 en una sola construcción pBRES para alojar un nuevo ligando con dos características selectivas.

5 En una estrategia similar a la de los análogos en posición 15 y 16, los compuestos con modificaciones en las posiciones 4 y 7 (Figura 15) se han ensayado para determinar la actividad antiprogestina en el ensayo basado en células T47D (Figura 16), Los compuestos BLX-952 y BLX-610 son antiprogestinas mucho más débiles que MFP o cualquier otro compuesto ensayado hasta ahora: incluso a concentraciones de 100 nM, estos dos compuestos no pueden inhibir completamente el receptor de progesterona en este ensayo. Si esta actividad antiprogestina débil se correlaciona con éxito con una activación pBRES débil, pueden identificarse conflictos dentro del sitio de unión y anularse. Los restos hidroxilo y éster en la posición 7 parecen estar en conflicto con Met 756 dentro del LBD del modelo de homología de MR. Esta metionina puede reducirse a una alanina para introducir un solo orificio para alojar las irregularidades sobre el ligando o puede intentarse la instalación de una red de unión de hidrógeno más avanzada usando ácido aspártico o glutámico. Cualquier interacción MR mutante/compuesto beneficiosa descubierta para posiciones individuales cerca del bolsillo de unión puede combinarse en un solo sistema mediante síntesis química del ligando y mutagénesis dirigida del bolsillo de unión. Esta combinación de diversos elementos potenciadores de especificidad individuales en un solo complejo MR-MA puede mejorar exponencialmente la selectividad contra RP y otras proteínas endógenas.

20 El actual complejo MA-MR 39 veces selectivo se ensayará en estudios de modelos animales. El trabajo con modelo animal previo realizado durante la optimización del sistema de expresión pBRES proporciona un fuerte protocolo para el ensayo así como los criterios para conseguir mediante un sistema de expresión génica regulado por MA-MR nuevo con éxito. Los modelos animales existentes incluyen formación de imágenes en vivo de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) o genes indicadores luciferasa en ratones C57BU6 y el modelo de enfermedad de Encefalopatía Autoinmune Experimental (EAE) para Esclerosis Múltiple (EM) en ratones S.JL. En resumen, se administró ADN de pBRES mediante inyección intramuscular (i.m.) en los músculos tibiales y gastrocnemio de cada pata trasera seguido por electroporación con electrodos de calibre 20 (Inovio, San Diego CA, 8 impulsos a 200 V/cm, 1 Hz, 20 ms/impulso). La MA (MFP o BLX-913) se administró mediante inyección i.p. a 0,33-1,00 mg/kg en aceite de sésamo los días 7-10. La expresión de SEAP o genes indicadores de luciferasa se supervisó mediante formación de imágenes *in vivo* de las patas traseras de ratón y permite la comparación de los sistemas de expresión génicos regulados pBRES/MFP y V729L W755A pBRES/ BLX-913. El modelo de enfermedad EAE murino permite una caracterización adicional del nuevo complejo pBRES/ BLX-913 en el contexto de datos de eficacia existentes para el complejo pBRES/MFP.

35 **Resumen:** Una ventaja de las nuevas MA y MI de la presente invención es que se unen selectivamente a una sola MR que tiene modificaciones que potencian esta selectividad. Por lo tanto, las nuevas MA y MI de la presente invención tienen propiedades mejoradas que se unen selectivamente o de otra manera interactúan con una sola y/o específica MR de la presente invención y disminuyen o eliminan la reactividad cruzada con proteína endógenas, particularmente proteínas humanas endógenas, por ejemplo un RP endógeno u otros receptores de esteroides endógenos. En algunas realizaciones, una nueva MA o MI de la presente invención es un análogo de ligando de RP, más particularmente una antiprogestina modificada, por ejemplo, una MFP modificada. En una realización, el análogo ligando de RP se une selectivamente a una MR que tiene un LBP modificado, y tiene efectos secundarios reducidos o nulos, por ejemplo, con respecto a la reactividad cruzada con RP endógeno y otros receptores de esteroides endógenos, actividad abortiva o anticonceptiva.

45 En determinadas realizaciones en las que una MFP modificada es la MA, la dosis de la MFP usada para activar una MR de la presente invención es 100 veces menor que la actividad abortiva indicada de este compuesto. Sin embargo, la presente invención también proporciona nuevas MA que son selectivas y específicas para una sola y nueva MR de tal manera que la nueva MA tiene escaso o ningún efecto farmacológico sobre una proteína endógena dentro del organismo, por ejemplo, un RP y receptor de glucocorticoides (RG). Como se describe en el presente documento, se identificaron compuestos que tenían una escasa o ninguna actividad contra la RP *in vitro* (como se mide, por ejemplo, en el ensayo secundario basado en T47D). En una realización, en la que los Bolsillos de Unión a Ligando (LBP) bolsillos de RP y MR son idénticos, un compuesto que es inactivo contra el RP es también inactivo estimulando el sistema pBRES, que es un aspecto no limitante de esta realización. En algunas realizaciones, el nivel de actividad de un compuesto nuevamente identificado en el sistema pBRES puede usarse como una fuente de SAR, pero esto no está limitado en el presente documento como un criterio de selección.

55 Como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones, el ensayo pBRES-Luc (pBRES-luciferasa) puede usarse para identificar compuestos inactivos en una exploración dirigida. En una realización, la correlación entre la activación pBRES y las actividades antiprogestinas, se usaron para identificar compuestos que no activan el sistema pBRES, y también probablemente carecen de actividad antiprogestina. La ausencia de actividad antiprogestina se confirmó para cada compuesto prometedor en el ensayo basado en T47D para la actividad antiprogestina. Por lo tanto, los datos de este ensayo secundario anti-RP se usaron para confirmar la identidad de los compuestos prometedores de la presente invención. En esta realización, la construcción MR original (pGT79) se usó como control en los ensayos de luciferasa de las MR modificadas por ingeniería genética con nuevos candidatos MA para proporcionar un punto de referencia con respecto a mejoras con respecto a los niveles de inducción en las MR modificadas por ingeniería genética respecto a un nuevo compuesto MA, que tiene poca actividad contra la MR

original y, lo que es más importante, contra el RP. La MR original igualmente inactiva se incluyó como una referencia o control.

La estrategia anterior puede usarse para identificar compuestos que no unen o inhiben el RP humano debido a una característica estructural en el compuesto. Por lo tanto, una molécula MR modificada genéticamente puede desarrollarse para aceptar este nuevo compuesto como la MA. Usando esta estrategia, una característica clave del sistema modificado por ingeniería genética es que el compuesto MA no interacciona con RP. Adicionalmente, los esteroides endógenos no activan la MR modificada por ingeniería genética debido a un truncamiento de 19 aminoácidos en el LBD dentro de la MR en comparación con hPR. Una vez que un compuesto líder se ha identificado para caracterización adicional, este puede explorarse usando ensayos *in vitro*, *in vivo* y basados en células descritos en el presente documento o en Fuhrmann, U., y col. (2000) J. Med. Chem. 43: 5010-5016.

La Figura 55 ilustra una realización ejemplar y no limitante del sistema de expresión pBRES. En esta realización, la unión de MFP a MR activa la MR y da como resultado la expresión posterior de la MT a partir del sistema de expresión pBRES. MFP es un antagonista conocido para diversos receptores esteroides humanos endógenos, que pueden posiblemente dar como resultado efectos secundarios no deseados.

La Figura 56 ilustra una estrategia ejemplar y no limitante para explorar nuevas moléculas activadoras y moléculas reguladoras. (1) Se identifican nuevas MA a partir de una exploración directa de análogos de ligando de RP que no interaccionan con el RP humano endógeno debido a la presencia de perturbaciones estéricas o iónicas sobre el compuesto. (2) Se usa mutagénesis guiada por modelado para introducir mutaciones compensatorias en el LBP de la MR, creando por lo tanto moléculas MR modificadas por ingeniería genética. (3) La nueva MA se usa junto con la MR modificada por ingeniería genética para producir un complejo MA-MR activo con propiedades mejoradas, por ejemplo, una disminución o eliminación de efectos secundarios no deseados o una reacción cruzada con proteínas endógenas, particularmente proteínas humanas endógenas, por ejemplo, receptores esteroides humanos endógenos.

La Figura 57 ilustra una estrategia ejemplar y no limitante para desarrollar un complejo MA-MR selectivo usando la SAR a partir de dos o más pares MA-MR moderadamente selectivos. (1) Se identifica una nueva MA1 usando una estrategia indicada en la Figura 57 y se instalan mutaciones compensatorias en la región 1 dentro del LBP de la MR para crear un complejo MA1-MR1 moderadamente selectivo. (2) Se identifica una nueva MA2 usando la estrategia descrita en la Figura 57 y se realizan mutaciones compensatorias en la región 2 dentro del LBP de la MR para crear un complejo MA2-MR2 moderadamente selectivo. (3) Usando síntesis química, se combinan modificaciones que confieren selectividad de MA1 y MA2 en un compuesto, MA3. Las mutaciones compensatorias en las regiones 1 y 2 dentro del LBP se combinan dentro de una sola construcción MR3 usando mutagénesis dirigida. Aprovechando dos o más características que confieren selectividad, MA3 se usa junto con MR3 para producir un complejo MA-MR con mayor selectividad en comparación con MA1 o MA2.

## Materiales y métodos

**A. Eficacia de la Transferencia Basada en Genes de la Proteína IFN- $\beta$  en EAE Agudo de Ratón:** Se inmunizaron setenta ratones SJL hembra de 8 semanas de vida de Jackson Labs con una inyección SC de 0,1 ml (dividida entre la base de la cola y dorso superior) que contenía Proteína Proteolípídica (PLP) 150 ug 139-151 en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) complementado con 200 ug de *M. tuberculosis* H37Ra. Esta emulsión se obtuvo mezclando solución salina que contenía PLP 3 mg/ml 1:1 con IFA que contenía *M. tuberculosis* molida 4 mg/ml. Inmediatamente después de la inmunización, todos los ratones recibieron una inyección IP de 0,1 ml de toxina tosferínica. Dos días después de la inmunización (día 3 del estudio), todos los ratones recibieron una segunda inyección IP de toxina tosferínica.

Los ratones tratados con proteína IFN- $\beta$  o su vehículo (NaAc 20 nM, pH 5,5, NaCl 150 mM, propilenglicol al 5 %) se dosificaron con 0,1 ml, SC una vez cada dos días comenzando el día de la inmunización hasta el final del estudio. Los controles positivos usados para este estudio fueron 9 mg/kg de Mesopram (ZK-117137) y 2,5 mg/kg de Prednisolona. Ambos controles usaron un volumen de dosis de 0,1 ml/inyección y se administraron IP, dos veces al día, comenzando la mañana de las inmunizaciones hasta el final del estudio.

### Grupos experimentales (n=10):

1. Vehículo
2. IFN- $\beta$  murino 10 K unidades
3. IFN- $\beta$  murino 20 K unidades
4. IFN- $\beta$  murino 30 K unidades
5. IFN- $\beta$  murino 100 K unidades
6. Mesopram, 9 mg/kg IP
7. Prednisolona, 2,5 mg/kg IP

**Puntuación clínica de EAE agudo de ratón:** Los ratones se puntuaron diariamente basándose en el siguiente sistema de puntuación:

- 0 = normal
- 1 = cola flácida
- 2 = dificultad para enderezarse
- 3 = parálisis incompleta de una o ambas patas traseras
- 4 = parálisis completa de una o ambas patas traseras o patas traseras móviles pero con arrastre
- 5 = parálisis completa de ambas patas traseras y debilidad/parálisis de patas delanteras, moribundo o muerto

Los ratones moribundos se sacrificaron. Se añadieron la mitad de las puntuaciones a ratones que presentaban síntomas clínicos límite. Los ratones tratados con 100K unidades de IFN- $\beta$  desarrollaron puntuaciones clínicas significativamente disminuidas de EAE en comparación con ratones tratados con vehículo ( $p=0,0046$ ). Los ratones tratados con 30K unidades de IFN- $\beta$  también desarrollaron puntuaciones clínicas disminuidas en comparación con los ratones tratados con vehículo, aunque este descenso no alcanzó una significación estadística. Los controles positivos en este estudio, Mesopram y Prednisolona, también disminuyeron significativamente las puntuaciones clínicas. Véase Ejemplo 5 y Figura 13.

**B. Eficacia de la Transmisión Basada en Genes del IFN- $\beta$  Murino en EAE Aguda de Ratón:** Se inmunizaron ciento treinta ratones SJL hembra de 8 semanas de vida de Jackson Labs con una inyección SC de 0,1 ml (dividida entre la base de la cola y dorso superior) que contenía 150 ug de Proteína Proteolipídica (PLP) 139-151 en Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) complementado con 200 ug de *M. tuberculosis* H37Ra. Esta emulsión se obtuvo mezclando solución salina que contenía PLP 3 mg/ml 1:1 con IFA que contenía 4 mg/ml de *M. tuberculosis* molido. Inmediatamente después de la inmunización, todos los ratones recibieron una inyección IP de 0,1 ml de toxina tosferínica. El día 2 los ratones en los grupos plásmido + electroporación recibieron inyecciones intramusculares apropiadas seguido inmediatamente por electroporación. Los ratones en los grupos plásmido + PINC también recibieron las inyecciones intramusculares apropiadas. Dos días después de la inmunización (día 3 del estudio), todos los ratones recibieron una segunda inyección IP de 0,1 ml de toxina tosferínica. El día 5, los ratones en los grupos plásmido + PINC recibieron el mismo tratamiento que el del día 2.

Los ratones tratados con la proteína IFN- $\beta$  o su vehículo (NaAc 20 nM, pH 5,5, NaCl 150 mM, propilenglicol al 5 %) se dosificaron con 0,1 ml SC una vez cada dos días comenzando el día de la inmunización hasta el final del estudio. Los controles positivos usados para este estudio fueron 9 mg/kg de Mesopram (ZK-117137) y 2,5 mg/kg de Prednisolona. Ambos controles usaron un volumen de dosis de 0,1 ml/inyección y ambos controles se administran IP, dos veces al día, comenzando la mañana de las inmunizaciones hasta el final del estudio.

Hubo un total de 10 grupos en este estudio. Cada grupo tenía 13 ratones. A los 3 últimos ratones de cada grupo se les extrajo sangre mediante un corte en la cola el día 6 del estudio para análisis de ARN Mx 1. A los 3 mismos animales a los que se extrajo sangre el día 6, se les extrajo sangre mediante punción cardiaca el día 13 del estudio para análisis de ARN Mx1 de CMSP y los músculos inyectados se recogieron para análisis.

#### Grupos experimentales (n=13):

- 1. control con PBS
- 2. pNull + EP
- 3. pmIFN- $\beta$  + EP
- 4. pNull + PINC
- 5. pmIFN- $\beta$  + PINC
- 6. proteína IFN- $\beta$  (100K unidades) SC
- 7. Vehículo, SC
- 8. Mesopram, 9 mg/kg IP
- 9. Prednisolona, 2,5 mg/kg IP
- 10. Sin tratar

**Puntuación clínica de EAE:** Los ratones se puntuaron diariamente basándose en el siguiente sistema de puntuación:

- 0 = normal
- 1 = cola flácida
- 2 = dificultad para enderezarse
- 3 = parálisis incompleta de una o ambas patas traseras
- 4 = parálisis completa de una o ambas patas traseras o patas traseras móviles pero con arrastre
- 5 = parálisis completa de ambas patas traseras y debilidad/parálisis de patas delanteras, moribundo o muerto

Los ratones moribundos se sacrificaron. Se añadieron la mitad de las puntuaciones a los ratones que presentaban síntomas clínicos límite. Los ratones tratados con 100K unidades de proteína IFN- $\beta$  murina tuvieron puntuaciones clínicas significativamente disminuidas de EAE, en comparación con los ratones tratados con control vehículo ( $p=0,045$ ). La transferencia génica de IFN- $\beta$  murino + EP también disminuyó significativamente las puntuaciones clínicas, en comparación con la transferencia génica de pNull y EP ( $p=0,0171$ ). La transferencia génica usando la formulación PINC de IFN- $\beta$  no disminuyó estadísticamente las puntuaciones clínicas en comparación con pNull y

PINC. Tanto el Mesopram como la Prednisolona, los controles positivos para el modelo EAE, disminuyeron significativamente las puntuaciones clínicas.

### C. Expresión Regulada de mIFN- $\beta$ *In Vivo*

- 5 **IFN15-GSS: Transfección *in vivo* de plásmidos BRES-1/IFN:** Demostración de la expresión del interferón-beta murino (mIFN- $\beta$ ) regulada por mifepristona (MFP) de una plásmido BRES-1/mIFN- $\beta$  electroporado en músculo de ratón.

**Diseño Experimental:** A ratones normales C57Bl/6 se les inyectó y electroporó un solo vector BRES-1 de la presente invención y ADN plasmídico control como se describe en las Tablas 34 y 35 a continuación.

**Tabla 34**

Plásmido	Descripción	fecha	ug/ul
pGT4	Vector vacío BRES-1. Control negativo para pGT26.	23/4/04	6,35
pGT26	MR/mIFN- $\beta$ inverso. Experimental	14/4/04	4,73
	Plásmido BRES-1/mIFN- $\beta$ .	16/4/04	4,80
pGER101	pgWiz/mIFN- $\beta$ (CMV/mIFN- $\beta$ ). Control positivo para la expresión de mIFN- $\beta$ .	18/2/04	5,73
pGT31	SEAP/RM. Control positivo para la función de MR.	23/4/04	5,78

10

**Tabla 35 Grupos (n = 5/grupo)**

Grupo	plásmido	momentos		
		día 7	día 11	día 18
1	ninguno	- MFP		
2	pGT4	- MFP	+ MFP	
3	pGT26	- MFP		
4	pGER101	- MFP		
5	pGT26		- MFP	
6	pGT26		+ MFP	
7	pGER101		- MFP	
8	pGT26		- MFP	- MFP
9	pGT26		+ MFP	- MFP
10	pGER101		- MFP	- MFP
11	pGER101		+ MFP	
12	pGT31	- MFP	+ MFP	- MFP
13	ninguno		- MFP	

15

La expresión de mIFN- $\beta$  puede ensayarse por biomarcadores y niveles de ARN en músculo en 3 momentos. El día 7 después de la inyección con ADN los Grupos 1, 3 y 4 pueden recogerse terminalmente y puede extraerse sangre del Grupo 2 por la cola para determinar el fondo no inducido de la expresión de mIFN- $\beta$  y la actividad biomarcadora en ratones que recibieron GS/mIFN - MFP (Grupo 3) en comparación con ratones a los que no se les inyectó (Grupo 1) y ratones que recibieron vector vacío BRES-1 (Grupo 2). CMV/mIFN (Grupo 4) sirve como un control positivo. Puede extraerse sangre del Grupo 12 por la cola para determinar niveles de fondo no inducidos de expresión SEAP.

20

Ratones en los Grupos 2, 6, 9, 11 y 12 pueden tratarse con MFP los días 7-10 después de inyección con ADN. El día 11, los Grupos 5-7 pueden recogerse terminalmente para determinar la expresión de mIFN inducida y la actividad biomarcadora en ratones que recibieron MR/mIFN + MFP (Grupo 6) en comparación con ratones que recibieron CMV/mIFN (Grupo 7). También se ensayaron niveles no inducidos en ratones que recibieron MR/mIFN -

5 MFP (Grupo 5). Puede extraerse sangre del grupo 2 (vector vacío BRES-1) terminalmente para determinar si MFP estimula la respuesta a biomarcador. Puede extraerse sangre de los Grupos 8-10 por la cola para determinar si la actividad biomarcadora es detectable a partir de pequeños volúmenes de sangre y proporcionar un momento inducido en los mismos ratones con los que se compararon los niveles inducidos el día 18. El Grupo 11 (CMV/mIFN + MFP) puede recogerse terminalmente para determinar si MFP afecta en la expresión de mIFN o inhibe la respuesta a biomarcador. El Grupo 12 puede sangrarse por la cola para determinar niveles inducidos de expresión SEAP. El Grupo 13 proporcionará un control negativo para la expresión SEAP.

10 El día 18, ocho días después del último tratamiento con MFP, los Grupos 8-10 pueden recogerse terminalmente para determinar si los niveles de ARN de mIFN-β y actividad biomarcadora en el grupo MR/mIFN -/+ MFP (Grupo 9) habían regresado a la línea basal en comparación con los ratones MR/mIFN que nunca recibieron MFP (Grupo 8). CMV/mIFN (Grupo 10) de nuevo sirvió como un control positivo. Puede extraerse sangre del Grupo 12 terminalmente para determinar si la expresión SEAP ha vuelto a la línea basal.

**D. Reactivos**

15 **Soluciones de ADN:** Cada ratón en los Grupos 2-11 puede recibir 250 ug de ADN plasmídico en 150 ul de PBS. Cada ratón en el Grupo 12 puede recibir 25 ug de ADN plasmídico en 150 ul de PBS (véase Tabla 36 a continuación).

**Tabla 36:** Soluciones de ADN preparadas para 5 ratones/grupo más extra

Grupo	Plásmido	Nº de ratones	Solución preparada para	mg ADN	mg/ml	ADN	ml total	PBS
2	pGT4	5	8 ratones	2,0	6,35	315 ul	1,2	0,89 ml
3, 5, 6, 8, 9	pGT26	25	32 ratones	8,0	4,73 4,80	1,2 ml 0,48 ml	4,8	3,12 ml
4, 7, 10, 11	pGER101	20	25 ratones	6,25	5,73	1,09	3,75	2,66 ml
12	pGT31	5	8 ratones	0,2	5,78	35 ul	1,2	1,17 ml

**E. Procedimiento con Animales**

20 **1) Transferencia de ADN (Grupos 2-12):** A ratones C57Bl/6 macho adultos (5 por grupo) se les inyectaron bilateralmente el día 12 250 ug (Grupos 2-11) o 25 ug (Grupo 12) de ADN plasmídico por ratón en 150 ul de PBS. La solución de ADN puede inyectarse 25 ul en el músculo tibial y 50 ul en el músculo gastrocnemio de cada pata trasera seguido por electroporación con un calibrador (8 impulsos a 200 V/cm, 1 Hz, 20 ms/impulso).

25 **2) Tratamiento con MFP (Grupos 2, 6, 9, 11 y 12):** A los ratones en los Grupos 2, 6, 9, 11 y 12 puede administrarse MFP por sonda oral a 0,33 mg/kg (100 ul de 0,083 mg/ml en aceite de sésamo, recién preparado) los días 7 a 10 postinyección) como se indica en la Tabla 37 a continuación. Puede extraerse sangre de los ratones del Grupo 12 antes de tratamiento con MFP el día 7.

**Tabla 37**

Grupo	día 7	día 8	día 9	día 10	día 11	día 18
1) sin inyección	Extracción de sangre terminal + músculos					
2) vector vacío (pGT4)	Extracción de sangre por la cola después MFP	MFP	MFP	MFP	sangrado terminal + músculos	
3) MR/mIFN (pGT26) - MFP	Extracción de sangre terminal + músculos					
4) CMV/mIFN (pGER101)	Extracción de sangre terminal + músculos					
5) MR/mIFN (pGT26) - MFP					Extracción de sangre terminal + músculos	
6) MR/mIFN (pGT26) +/- MFP	MFP	MFP	MFP	MFP	Extracción de sangre terminal + músculos	

(continuación)

Grupo	día 7	día 8	día 9	día 10	día 11	día 18
7) CMV/mIFN (pGER101)					Extracción de sangre terminal + músculos	
8) MR/mIFN (pGT26) - MFP					Extracción de sangre por la cola	Extracción de sangre terminal + músculos
9) MR/mIFN (pGT26) +/- MFP	MFP	MFP	MFP	MFP	Extracción de sangre por la cola	Extracción de sangre terminal + músculos
10) CMV/mIFN (pGER101)					Extracción de sangre por la cola	Extracción de sangre terminal + músculos
11) CMV/mIFN (pGER101) +/- MFP	MFP	MFP	MFP	MFP	Extracción de sangre terminal + músculos	
12) SEAP/MR (pGT31)* +/- MFP	Extracción de sangre por la cola, después MFP	MFP	MFP	MFP	Extracción de sangre por la cola	Extracción de sangre terminal
13) sin inyección					Extracción de sangre terminal	

\*se construyó pGT31 por digestión de pGER75 (CMV/SEAP) con Nhe I y Not I e inserción del fragmento resultante que llevaba el gen SEAP entre los sitios Spe I y Not I de pGT1.

**3) Recogida de sangre y músculo (Grupos 1-11):** El día apropiado después de inyección de ADN como se indica en la Tabla 6 anterior, a los ratones se les extrajo sangre por la cola o terminalmente. Cuando se extrajo sangre a los ratones terminalmente, los músculos inyectados pudieron recogerse.

5 **Sangre.** La sangre puede recogerse en tubos Microtainer (que contienen EDTA) a TA y después pueden separarse y recogerse las CMSP. El plasma restante puede conservarse a -20 °C para ensayos de citocinas.

**Músculos:** Los músculos inyectados de ambas patas pueden recogerse, agruparse entre sí y cortarse en trozos no mayores de 5 mm de lado. Aproximadamente un cuarto del músculo cortado puede colocarse en 1,5 ml de solución RNA-Later en un tubo de 2 ml. El resto del músculo puede conservarse a -70 °C. El ADN y ARN puede extraerse de las muestras de músculos en solución RNA-Later. Las muestras pueden conservarse a 4 °C durante al menos 24 h y después transferirse a -20 °C si pueden conservarse durante más de 5 días.

10 **Sangre (Grupos 12 y 13):** A los ratones en el Grupo 12 se les puede extraer sangre de la cola el día 7 y día 11 y se les puede extraer sangre terminalmente el día 18 en tubos Microtainer amarillos (sin anticoagulante). A los ratones se les pudo extraer sangre antes de tratamiento con MFP el día 7. A los ratones en el Grupo 13 se les puede extraer sangre terminalmente el día 11 en tubos Microtainer amarillos (sin anticoagulante).

#### 4) Procedimientos de Análisis/Ensayo de Punto Final

20 **Resultados de Ensayos con Biomarcador:** El ARN Mx1 de ambas quimiocinas (IP-10 y JE) mostró escasa o ninguna actividad con BRES-1-mIFN- $\beta$  (pGT26) en ausencia de MFP al 7º día. Todos los biomarcadores se indujeron fuertemente a niveles mayores que con CMV-mIFN- $\beta$ , en presencia de MFP los días 11. Al día 18, en ausencia de MFP, los niveles de quimiocina regresaron a la línea basal y el ARN Mx1 disminuyó casi a la línea basal. Véase las Figuras 18 y 19.

**ARN Mx1 de CMSP:** El ARN puede prepararse de las CMSP separadas y ensayarse para ARN Mx1 por TaqMan.

**Proteína JE e IP-10 de plasma:** El plasma puede ensayarse para detectar las citoquinas JE e IP-10 por ELISA.

25 **ARN de mIFN- $\beta$  de músculo:** El ARN puede prepararse a partir de músculos inyectados y ensayarse para ARN mIFN- $\beta$  por TaqMan.

**ADN plasmídico de músculo:** El ADN puede prepararse a partir de músculos inyectados y ensayarse para ADN plasmídico por TaqMan. Los cebadores y sondas específicos para el promotor del CMV pueden usarse para ADN a partir de los Grupos 4, 7, 10 y 11. Los cebadores y sonda específicos para el dominio de unión al ADN de GAL-4 de la proteína reguladora pueden usarse para los Grupos 2, 3, 5, 6, 8 y 9.

30 **Proteína SEAP de suero:** El suero puede ensayarse para expresión SEAP mediante el ensayo de actividad quimioluminiscente usando el suero de los ratones del Grupo 13 como diluyente.

#### F. Construcción de Vectores Plasmídicos

- 5 **pGER101 (pgWiz/mIFN):** El gen IFN- $\beta$  de ratón (mIFN- $\beta$ ) se amplificó por PCR a partir del vector plasmídico pbSER189 (Figura 20A) con la secuencia de señal mIFN situada en el cebador 5' y los sitios de enzimas de restricción Sal I y Not I añadidos en los extremos 5' y 3'. El fragmento se digirió con Sal I y Not I y se insertó en los sitios Sal I y Not I del vector plasmídico pgWIZ (Figura 20B) dando como resultado un vector plasmídico pGER101 (Figura 20C).
- pGER125 (pgWiz/hIFN):** El gen IFN- $\beta$  humano (hIFN- $\beta$ ) se amplifica por PCR a partir del vector plasmídico pbSER178 con la secuencia de señal hIFN reemplazada en el cebador 5' y sitios de enzimas de restricción Sal I y Not I añadidas en los extremos 5' y 3'. El fragmento se digirió con Sal I y Not I y se insertó en los sitios Sal I y Not I del vector plasmídico pgWIZ, dando como resultado el vector plasmídico pGER125 (Figura 21).
- 10 **pGene/V5-HisA:** El vector plasmídico se adquirió de Invitrogen y contenía 6 sitios de unión GAL-4 cadena arriba de un promotor mínimo (E1b TATA), una región no traducida 5' (UTR), que es UT12 derivada de CMV, un intrón sintético 8 (IVS8), un sitio de clonación múltiple (MCS) y el sitio poli(A) de la hormona del crecimiento bovino (bGH). Los genes insertados en el MCS pueden regularse por una molécula reguladora (MR). Por ejemplo, un gen insertado en el MCS puede introducirse por la forma activada del receptor de progesterona modificado (por ejemplo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22 o codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 21) después de la unión de la MR activada a los sitios GAL-4 (Figura 22).
- 15 **pGene-mIFN (pGER127):** El vector plasmídico pGER101 se digirió con Sal I, se rellenoó con Klenow, se ligó a engarces Hind III y se digirió con Hind III y Not I. El fragmento génico mIFN- $\beta$  se insertó en los sitios Hind III y Not I del vector plasmídico pGene/V5-HisA dando como resultado el vector plasmídico pGene-mIFN (Figura 23).
- 20 **pGene-hIFN (pGER129):** El vector plasmídico pGER125 se digirió con Sal I, se rellenoó con Klenow, se ligó a engarces Hind III y se digirió con Hind III y Not I. El fragmento génico mIFN- $\beta$  se insertó en los sitios Hind III y Not I del vector plasmídico pGene/V5-HisA dando como resultado el vector plasmídico pGene-hIFN (pGER129) (Figura 24).
- 25 **pSwitch:** El vector plasmídico se adquirió de Invitrogen y codifica el receptor de progesterona modificado (por ejemplo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22 o codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 21) ligado a un promotor sensible a MR autoinducible (4 sitios de unión al ADN 4XGAL y promotor de timidina quinasa (tk) cadena arriba de la región no traducida 5' 12 (UT12) derivado de CMV y un intrón sintético 8 (IVS8) que conduce la expresión del gen para la proteína MR (Figura 25).
- 30 **pGS1694:** El vector plasmídico pGS1694 lo proporcionó Valentis y contiene el promotor de actina de músculo esquelético de pollo (pro actina de m.e.), la región no traducida 5' 12 (UT12) y el intrón sintético 8 (IVS8) que conduce la expresión del gen que codifica el receptor de progesterona modificado (por ejemplo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22 o codificado por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 21) (Figura 26).
- 35 **pLC1674:** El vector plasmídico pLC1674 fue proporcionado por Valentis y contiene un promotor "sensible a MR" (es decir, un promotor sensible a la forma activada del receptor de progesterona modificado (por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22 o codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 21), la región no traducida 5' 12 (UT12) e intrón sintético 8 (IVS8) conduce la expresión del gen que codifica el gen de luciferasa de luciérnaga (luc) (Figura 27).
- G. Construcción de Vectores para la Producción de Virus**
- 40 En la técnica se conocen vectores para la producción de virus (por ejemplo, plásmidos lanzadera) y procedimientos de producción de virus (por ejemplo, virus AAV-1) y pueden usarse para producir los virus de la presente invención. En algunas realizaciones los virus de la presente invención se producen a partir de plásmidos lanzadera (véase por ejemplo, la Tabla 38) y usarse para la administración y expresión de una molécula de la presente invención (por ejemplo, una MT y/o MR codificada por una secuencia contenida en el vector) en las células de un sujeto para el
- 45 tratamiento de enfermedades.
- pGT2/mGMCSF y pGT/hGMCSF:** Los plásmidos lanzadera pGT2/mGMCSF y pGT/hGMCSF se construyeron de la siguiente manera (Figura 28). Un fragmento que codificaba la GMCSF de ratón (mGM-CSF) se escindió de pORF9-mGMCSF (Figura 30) mediante digestión del plásmido vector con AgeI y NheI. Después este fragmento se dejó romo. De manera similar un fragmento que codificaba (hGM-CSF) humano se escindió de pORF-hGMCSF (Figura 30) por digestión con el plásmido vector con SgrAI y NheI. Después este fragmento se dejó romo. El fragmento escindió y romo que codificaba mGMCSF o hGMCSF se insertó en el sitio EcoRV del plásmido vector pGT2. Después la orientación del inserto se controló por mapeo de digestión por enzimas de restricción. Los plásmidos lanzadera resultantes se denominaron pGT2/mGMCSF (que codifica GMCSF de ratón) y pGT2/hGMCSF (que codifica GMCSF humana) (Figura 28).
- 50 **pZac2.1-RM-hGMCSF y pZac2.1-RM-mGMCSF:** Se construyeron los plásmidos lanzadera pZac2.1-MR-hGMCSF y pZac2.1-MM-mGMCSF de la siguiente manera (Figura 29A). Un fragmento que codifica un GMCSF de ratón se escindió del plásmido pORF9-mGMCSF (Figura 30) digiriendo el plásmido con AgeI y NheI y se dejó romo, y el
- 55



fragmento como resultante se insertó en el sitio EcoRV del plásmido pGT2 dando como resultado el plásmido pGT2/mGMCSF. De manera similar, se escindió un fragmento que codificaba GMCSF humano del plásmido pORF-hGMCSF (Figura 30) digiriendo el plásmido con SgrAI y NheI y se dejó como y el fragmento como resultante se insertó en el sitio EcoRV del plásmido pGT2, dando como resultado el plásmido pGT2/hGMCSF. Los insertos en los plásmidos de vector resultante se controlaron cada uno y se verificaron por mapeo con digestión con enzimas de restricción.

Los plásmidos de los vectores pGT2/hGMCSF y pGT2/mGMCSF después se digirieron cada uno con FseI y SrfI. Estos fragmentos BRES-1-GMCSF se dejaron como. El vector plásmido pZac2.1 se digirió con BglII y ClaI y se dejaron como. Cada uno de los fragmentos BRES-1-GMCSF como se ligó a un vector pZac2.1 como. Se verificaron los clones positivos por digestiones con enzimas de restricción. Los plásmidos lanzadera resultantes se denominaron pZac2.1-RM-hGMCSF (que codifica la GMCSF humana) y pZac2.1-RM-mGMCSF (que codifica GMCSF de ratón) (Figura 29A).

**pZac2.1-CMV-mGMCSF y pZac2.1-CMV-hGMCSF:** Se construyeron los plásmidos lanzadera pZac2.1-CMV-mGMCSF y pZac2.1-CMV-hGMCSF de la siguiente manera (Figura 29B). Cada uno de los fragmentos que codificaban un GMCSF y un fragmento que codificaba un GMCSF humano de ratón se clonaron por separado en el vector plasmídico pGENE/V5HisA (Invitrogen), dando como resultado, respectivamente, los plásmidos pGT723-GENE/hGMCSF (que codifica GMCSF humano) y pGT724-GENE/mGMCSF (que codifica GMCSF de ratón). Un fragmento que codifica GMCSF de ratón se escindió de pGT724/mGMCSF digiriendo el plásmido con KpnI y XbaI y un fragmento que codifica GMCSF humano se escindió de pGT723/hGMCSF digiriendo el plásmido con KpnI y XbaI. Cada uno de los fragmentos resultantes se insertó por separado en el sitio KpnI/XbaI del vector pZac2.1 que se había digerido con KpnI y XbaI y se trató con fosfatasa alcalina de ternero (CIP). Los plásmidos lanzadera resultantes se denominaron pGT713 (o pZac2.1-CMV-hGMCSF) que codifica GMCSF humano y pGT714 (o pZac2.1-CMV-mGMCSF) que codifica GMCSF de ratón (Figura 29B).

Se construyeron plásmidos lanzadera adicionales como se describe en la Tabla 38 a continuación.

**Tabla 38**

Plásmido Lanzadera	Descripción del Plásmido Lanzadera	Construcción del Plásmido Lanzadera para Producir Virus AAV-1
pGT61	Plásmido lanzadera AAV-1 que codifica mIFN- $\beta$ unido operativamente a un promotor del CMV	El fragmento SpeI-AscI de pGT26 que codifica el gen mIFN- $\beta$ se insertó en el sitio NheI-MluI de pZAC2.1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT61 que produce el virus AAV-1 GT61.
pGT62	Plásmido lanzadera AAV-1 que codifica hIFN- $\beta$ unido operativamente a un promotor del CMV	El fragmento SpeI-AscI de pGT30 que codifica el gen hIFN- $\beta$ se insertó en el sitio NheI-MluI de pZAC2.1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT62 que produce el virus AAV-1 GT62.
pGT54	Plásmido lanzadera AAV-1 que contiene BRES-1 que codifica mIFN- $\beta$	El fragmento SwaI-SbfI de pGT53 se ligó al fragmento SwaI-SbfI de pGT26 que contenía la secuencia BRES-1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT54 que produce el virus AAV-1 GT54.
pGT57	Plásmido lanzadera AAV-1 que contiene BRES-1 que codifica hIFN- $\beta$	El fragmento FseI-SrfI de pGT53 se ligó al fragmento FseI-SrfI de pGT28 que contenía la secuencia BRES-1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT57 que produce el virus AAV-1 GT57.
pGT58	Plásmido lanzadera AAV-1 que contiene BRES-1 que codifica hIFN- $\beta$	El fragmento SwaI-SbfI de pGT53 se ligó al fragmento SwaI-SbfI de pGT30 que contenía la secuencia BRES-1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT58 que produce el virus AAV-1 GT58.

(continuación)

<b>Plásmido Lanzadera</b>	<b>Descripción del Plásmido Lanzadera</b>	<b>Construcción del Plásmido Lanzadera para Producir Virus AAV-1</b>
pGT714	Plásmido lanzadera AAV-1 que codifica mGMCSF unido operativamente a un promotor del CMV	El fragmento que codifica mGMCSF del vector plasmídico pORF9-mGMCSF (Invitrogen) (Figura 30) se insertó en el sitio de clonación múltiple de pZAC2.1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT714 (Figura 29B, pZac2.1-CMV-mGMCSF) que produce el virus AAV-1GT714.
pGT713	Plásmido lanzadera AAV-1 que codifica hGMCSF unido operativamente a un promotor del CMV	El fragmento que codifica hGMCSF del vector plasmídico pORF9-hGMCSF (Invitrogen) (Figura 30) se insertó en el sitio de clonación múltiple de pZAC2.1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT713 (Figura 29B, pZac2.1-CMV-hGMCSF) que produce el virus AAV-1GT713.
pGT716	Plásmido lanzadera AAV-1 que contiene BRES-1 mGMCSF	Un fragmento acabado en punta roma que codificaba mGMCSF se insertó en el sitio EcoRV de pGT2 dando como resultado el vector plasmídico pGT712 y el fragmento Fsel-SrfI de pGT712 que contenía BRES-1-mGMCSF se enromó y se insertó en pZAC2.1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT716 (SEC ID N°: 42) que produce el virus AAV-1GT716 (véase Figura 31 B).
pGT715	Plásmido lanzadera AAV-1 que contiene BRES-1 hGMCSF	El fragmento de extremos romos que codifica hGMCSF se insertó en el sitio EcoRV de pGT2 dando como resultado el vector viral pGT2 y el fragmento Fsel-SrfI o pGT711 que contenía BRES-1-hGMCSF se enromó y se insertó en pZAC2.1, dando como resultado el plásmido lanzadera pGT715 (SEC ID N°: 41) que produce el virus AAV-1GT715 (véase Figura 31A).
pTR-mIFN- $\beta$	Plásmido lanzadera AAV-1 que codifica mIFN- $\beta$ unido operativamente a un promotor del CMV	El fragmento HincII-BsrBI romo de pgWIZ/WT IFN que codifica mIFN- $\beta$ se insertó en el sitio AgeI-Sall romo de pTReGFP, dando como resultado el plásmido lanzadera pTR-mIFN- $\beta$ (SEC ID N°: 43) que produce el virus pTR-mIFN- $\beta$ dando como resultado el plásmido lanzadera de pTR-mIFN- $\beta$ que produce el virus AAV-1TR-mIFN- $\beta$ .
pTR-hIFN- $\beta$	Plásmido lanzadera AAV-1 que codifica hIFN- $\beta$ unido operativamente a un promotor del CMV	El fragmento HincII/NotI romo de pgWIZ/ hIFN $\beta$ que codifica hIFN- $\beta$ se insertó en el sitio AgeI-Sall romo de pTReGFP, dando como resultado el plásmido lanzadera pTR-hIFN- $\beta$ (SEC ID N°: 44) que produce el virus AAV-1TR-hIFN- $\beta$ .
pGER75	Plásmido lanzadera AAV-1 que codifica SEAP unido operativamente a un promotor del CMV	Se amplificó un fragmento que codifica SEAP mediante PCR usando ADN pSEAP2 (Clontech) como un molde y el fragmento amplificado se insertó en el sitio NheI-XbaI del vector phRL-CMV (Promega), dando como resultado el plásmido lanzadera pGER75 que produce el virus AAV-1GER75.

En la Tabla 38 anterior, para las construcciones AAV-1-BRES-1, el plásmido lanzadera pZAC2.1 se modificó en MCS dando como resultado el plásmido lanzadera pGT53 para permitir la inserción del fragmento que contenía la secuencia BRES-1 en el vector. Para insertar el fragmento que contenía la secuencia BRES-1 en pGT53, el plásmido pGT apropiado (como se describe anteriormente en la Tabla 8) se digirió con enzimas de restricción, lo que dio como resultado un fragmento que contenía toda la secuencia BRES-1 que codificaba el IFN respectivo y este

5

fragmento se insertó en un sitio compatible de pGT53. Los plásmidos lanzadera AAV-1 resultantes se usaron para hacer preparaciones de virus AAV-1 como se describe en el presente documento usando procedimientos convencionales para la producción de virus AAV-1.

5 Para los plásmidos lanzadera que contenían el promotor del CMV, se aisló un fragmento que codificaba el gen de IFN respectivo a partir del vector plasmídico apropiado mediante digestión con enzimas de restricción y se insertó en el vector plasmídico pZAC2.1 en (a) sitio (o sitios) de restricción compatible como se describe en la Tabla 8 anterior.

10 Para los plásmidos lanzadera BRES-1 hGM-CSF, un fragmento SrgAI/NheI de pORF9-hGMCSF (Invitrogen) que codifica hGMCSF se enromó y se insertó en el sitio EcoRV de pGT2 dando como resultado pGT711. El fragmento FseI/SrfI de pGT712 que contenía toda la secuencia BRES-1 se enromó y se insertó en pZAC2.1 dando como resultado pGT715 (Figura 31 A).

Para los plásmidos lanzadera BRES-1 mGMCSF, un fragmento AgeI/NheI de pORF9-mGMCSF (Invitrogen) que codifica mGM-CSF se enromó y se insertó en el sitio EcoRV del vector pGT2 dando como resultado pGT712. El fragmento FseI/SrfI de pGT712 que contenía toda la secuencia BRES-1 se enromó y se insertó en pZAC2.1 dando como resultado pGT716 (Figura 31 B).

15 Los genes GM-CSF humano y de ratón de los plásmidos respectivos pORF9 (Invitrogen) se clonaron a través del plásmido pGENE/plásmido VSHisA (Invitrogen) de manera que cada uno pudiese escindirise con KpnI/XbaI y clonarse en pZAC2.1.

#### H. Construcción de la línea celular MCF 10A estable

20 La línea celular epitelial mamaria humana MCF 10A (ATCC, N° CRL-10317) se cultivó en discos de 10-cm. Las células se transfectaron con plásmido pGT137 (pBRES-Luc, selección con puromicina) usando reactivo de transfección Fugene 6 (Roche). En resumen, se diluyeron 6 µg de ADN y 36 µl de Fugene 6 en 750 µl de Opti-MEM sin suero. El ADN y Fugene 6 se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se cultivaron durante 2 días antes de la exploración con 1 µg/ml de puromicina durante 3 semanas. Se seleccionaron los clones positivos y se verificaron por ensayo de luciferasa para la expresión de pBRES-Luc y activación.

#### 25 I. Determinación de la Activación de pBRES por Medición con la Actividad Luciferasa

Todas las células se recogieron con una suave tripsinización, seguido por un lavado con PBS. Después las células se centrifugaron durante 5 minutos a 800 rpm y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo tisular. Después las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo (volumen de 100 µl/pocillo) en una placa de cultivo tisular negra de fondo plano de 96 pocillos en condiciones estériles. Posteriormente las células se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. Después de esto, en condiciones estériles, los medios se retiraron aspirando con cuidado y los pocillos se sustituyeron con 95 µl de medio recién preparado seguido por la adición de 5 µl/pocillo de compuesto diluido de forma apropiada o tampón control, dando como resultado concentraciones de compuesto final que variaban de 0,00064 a 50 nM (en DMSO al 0,05 % final). Después las placas de cultivo celular se taparon y se incubaron durante 24 h en una incubadora a 37 °C. Después de esto, se retiró el medio de las placas aspirando suavemente, las placas se secaron por transferencia y las células se lisaron con 5 µl/pocillo de reactivo de sustrato de ensayo luciferasa a partir del Kit del Sistema de Ensayo Luciferasa (Promega, Inc). Después las placas se sacudieron suavemente durante 1 minuto después de la adición de reactivo de sustrato luciferasa y posteriormente se midió la actividad enzimática luciferasa a diversos momentos (5 minutos, 30 minutos, 60 minutos) usando un Lector de Placa Luminiscente Microbeta (PerkinElmer) usando un protocolo de lectura de luciferasa normalizado).

#### J. Ensayo primario de pBRES-Luciferasa en células HEK 293

Para determinar los efectos de los compuestos de ensayo sobre la actividad pBRES en células 293 Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) (ATCC N° CRL-1573), las células se sembraron en placa en discos de 60 mm a  $5 \times 10^5$  células/disco en 5 ml de MEM alfa con L-glutamina 4 mM y FBS termoinactivado al 10 %. Las células se transfectaron 24 horas después con construcciones pBRES usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a una proporción de 1:2,5 de ADN (µg):reactivo de Lipofectamine 2000 (µl). El medio que contenía los complejos lipídicos se retiraron después de 4 horas y se dejó que las células se recuperasen en medio de cultivo recién preparado durante 24 horas. Las células se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo en medio de cultivo. Al día siguiente las células se trataron con MFP o compuesto de ensayo usando el mismo medio. Los compuestos se disolvieron en vehículo con etanol al 100 % y se diluyeron usando el medio de tratamiento. La concentración final de etanol en el medio de tratamiento fue del 0,1 %. Cada tratamiento consistió en tres copias. Veinticuatro horas después del tratamiento, se midió la actividad luciferasa de la siguiente manera: el medio se retiró y las células se lavaron una vez con PBS de Dulbecco. Las células se lisaron con 20 µl/pocillo de 1x Tampón de Lisis Pasiva (PLB, Promega) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación sobre un agitador de placa de titulación. Las placas se congelaron a -80 °C durante 20 minutos y después se descongelaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación en un agitador de placa de titulación. La actividad luciferasa se midió usando el sustrato del Sistema de Ensayo Luciferasa Promega (Cat. N° E1501) (100 µl/pocillo) usando un

luminómetro Berthold MicroLumat Plus.

#### **K. Ensayo RP secundario en células T47D**

5 Para determinar los efectos de los compuestos de ensayo sobre la actividad de la fosfatasa alcalina inducida por el receptor de Progesterona humano en células T47D de carcinoma de mama humano (ATCC N° HTB-133), las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo en medio de cultivo (RPMI1640 con piruvato sódico 1 mM, 0,2 unidades/ml de insulina, L-glutamina 4 mM y FBS al 10 %). Después de una noche de cultivo, el medio se cambió por medio de ensayo (RPMI1640 (sin rojo fenol) con piruvato sódico 1 mM, 0,2 unidades/ml de insulina, L-glutamina 4 mM y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %). Al día siguiente, las células se trataron con MFP o con los compuestos de ensayo en presencia de Promegestona 200 pM. Los compuestos se disolvieron en vehículo con etanol al 100 % y se diluyeron usando el medio de ensayo. La concentración final de etanol en el medio de ensayo fue del 0,2 %. Cada tratamiento consistió en 5 a 6 copias. Veinticuatro horas después del tratamiento, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina celular de la siguiente manera: el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con DPBS. Después el DPBS residual se retiró, se añadieron 50 µl de tampón de lisis celular (Tris-HCl 100 mM pH 9,8, Triton X-100 al 0,2 %) a cada pocillo y las placas se congelaron a -80 °C durante 30 minutos. Las placas se descongelaron a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación en un agitador de placa de titulación. Se añadieron 150 µl de tampón sustrato (Tris-HCl 100 mM pH 9,8, p-nitrofenil fosfato 4 mM) a cada pocillo. Se tomaron mediciones de absorbancia a intervalos de 5 minutos durante 1 hora a la longitud de onda del ensayo de 405 nm.

#### **L. Modelo de homología del LBD de MR**

20 Se creó el modelo de homología de LBD-MR basado en el complejo LBD/MFP de RG usando el elemento SwissModel de DeepView Swiss PDB Viewer versión 3.70 (Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997) Electrophoresis 18: 2714-2723). Brevemente, la secuencia de aminoácidos primaria correspondiente a los restos 640-914 del receptor de Progesterona humano (N° de Acceso NP\_000917) se ajustó sobre una estructura cristalina de rayos X del receptor 1 de Glucocorticoide humano NHZ.pdb y se remitió al servidor Swiss-Prot para la minimización. El ajuste del modelo resultante a la estructura cristalina de RG/MFP se examinó usando el programa informático Insight2 (Accelrys Software Inc.).

#### **M. Modelado de las interacciones del compuesto con LBD MR**

Se crearon modelos de MFP, BLX-913 y otros compuestos de ensayo unidos al bolsillo de unión a ligando de MR usando el Discovery Studio Viewer Pro versión 6.0 (Accelrys Software Inc.) y los restos de los sitios activos se identificaron mediante el rlig\_view script (Dr. Marc Adler, Biophysics Department, Berlex, no publicado).

#### **30 N. Mutagénesis dirigida**

Se instalaron mutagénesis dirigidas dentro de LBD de MR usando la estrategia de mutagénesis Quick Change utilizando los cebadores siguientes con el codón recién instalado subrayado. El esquema de numeración de aminoácidos sigue la numeración de aminoácidos de hPR. Se instalaron mutaciones sencillas en las posiciones 719 y 755 usando el molde pGT79. Se instalaron mutaciones dobles en las posiciones 729 y 726 usando el molde pGT1009 (W755A) (véase Tabla 39).

**N719Q (pGT1003) (SEC ID N°: 60)** 5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTC AGC AAC TAG GCG  
AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG CTG AAG ACT TGT CAG CAA AG -3';

**N719A (pGT1004) (SEC ID N°: 62)** 5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTG CCC AAC TAG GCG  
AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG GCC AAG ACT TGT CAG CAA AG -3';

**N719G (pGT1005) (SEC ID N°: 64)** 5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTG GCC AAC TAG GCG  
AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG GCC AAG ACT TGT CAG CAA AG -3';

**W755F (pGT1006) (SEC ID N°: 66)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTT TCA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT GAA AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**W755L (pGT1007) (SEC ID N°: 68)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTC TGA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT CAG AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**W755V (pGT1008) (SEC ID N°: 70)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTG TGA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT CAC AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**W755A (pGT1009) (SEC ID N°: 72)** 5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTG CCA TGA GCT TAA  
TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT GCC AGA ATA CTG AAT GAG AG -3';

**V729A/W755A (pGT1015) (SEC ID N°: 74)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC AGC CGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG GCT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3';

**V729G/W755A (pGT1016) (SEC ID N°: 76)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC AGG CGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG CCT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3';

**V729L/W755A (pGT1017) (SEC ID N°: 78)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC ACT GGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACC AGT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3';

**V729F/W755A (pGT1025) (SEC ID N°: 80)** 5'- GAG GCA ACT TCT TTC ATT CGT CAA  
GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG AAT GAA AGA AGT TGC  
CTC -3';

**L726V/W755A (pGT1020) (SEC ID N°: 82)** 5'- GGC GAG AGG CAA GTG CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG CAC TTG CCT CTC GCC -3';

**L726A/W755A (pGT1021) (SEC ID N°: 84)** 5'- GGC GAG AGG CAA GCC CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG GCC TTG CCT CTC GCC -3';

**L726G/W755A (pGT1022) (SEC ID N°: 86)** 5'- GGC GAG AGG CAA GGG CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG CCC TTG CCT CTC GCC -3';

**L726I/W755A (pGT1023) (SEC ID N°: 88)** 5'- GGC GAG AGG CAA ATC CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG GAT TTG CCT CTC GCC -3';

**L726F/W755A (pGT1024) (SEC ID N°: 90)** 5'- GGC GAG AGG CAA TTC CTT TCA GTA  
GTC AAG -3' y 5'- CTT GAC TAC TGA AAG GAA TTG CCT CTC GCC -3';

Tabla 39

<u>CAG</u> N719Q	<u>GTG</u> L726V	<u>GCC</u> V729A
<u>GCC</u> N719A	<u>GCC</u> L726A	<u>GCC</u> V729G
<u>GGC</u> N719G	<u>GGG</u> L726G	<u>GCC</u> V729G
	<u>ATC</u> L726I	<u>CTG</u> V729L
	<u>TTC</u> L726F	<u>TTC</u> V729F
N <sub>719</sub> Q L G E R Q L <sub>726</sub> L S V <sub>729</sub> V K W S K S		
5101 AAT CAA CTA GGC GAG AGG CAA CTT CTT TCA GTA GTC AAG TGG TCT AAA TC		
. L P G F R N L H I D D Q I T L I Q.		
5151 A TTG CCA GGT TTT CGA AAC TTA CAT ATT GAT GAC CAG ATA ACT CTC ATT C		
	<u>TTC</u> W755F	
	<u>CTG</u> W755L	
	<u>GTG</u> W755V	
	<u>GCC</u> W755A	
. Y S W <sub>755</sub> M S L M V F G L G W R S Y		
5201 AG TAT TCT TGG ATG AGC TTA ATG GTG TTT GGT CTA GGA TGG AGA TCC TAC		
K H V S G Q M L Y F A P D L I L N.		
5251 AAA CAC GTC AGT GGG CAG ATG CTG TAT TTT GCA CCT GAT CTA ATA CTA AA		

Representación de mutaciones instaladas hasta ahora en las posiciones 719, 726, 729 y 755 en la orientación de pGT79 del sistema pBRES.

##### 5 Validación *in vitro* del sistema RP modificado por ingeniería genética/BLX-913

Adicionalmente, la mutación doble en LBD V729L/W755A que se había observado que recuperaba la activación dependiente de BLX-913 del gen indicador luciferasa en células HEK293 se ensayó en células de músculo de ratón C2C12 usando luciferasa, Fosfatasa Alcalina Embrionaria Secretada murina (SEAP) y MT interferón beta humano (hIFNb). Previamente se ha descrito (Szymanski P y col., Mol Ther 2007; 15: 1340-1347) que la mejor orientación (es decir una que presenta el nivel más bajo de expresión de MT en ausencia de inductor y el nivel más alto de expresión MT en presencia de inductor) del casete RP y el casete MT depende de la identidad de la MT. Por tanto los autores de la presente invención evaluaron el nuevo inductor y el nuevo LBD de RP modificado por ingeniería genética en las cuatro orientaciones dentro de cada grupo de las MT, usando MFP o BLX-913 para inducir la expresión.

15 Los resultados se muestran en la Figura 58-60. En cada orientación con los tres transgenes ensayados anteriormente, el RP modificado por ingeniería genética conservó toda la actividad cuando se indujo con MFP.

Prácticamente en cada orientación y con cada transgén (con la excepción de pGT1050 y pGT1058, la combinación del nuevo inductor BLX-913y el RP modificado por ingeniería genética (\*) es un inductor de la expresión de MT tan bueno o mejor que el GS original con MFP. Estos estudios validan adicionalmente el compuesto BLX-913 y el pBRES de RP V729L/W755A como la nueva combinación pBRES-inductor con una selectividad mejorada sobre el Receptor de Progesterona humano.

##### 20 Validación *in vivo* del sistema RP modificado por ingeniería genética/BLX-913

Tras la conclusión del ensayo *in vitro*, se ensayó la orientación divergente de mSEAP y RP en pGT45 y pGT1048 una al lado de otra en un estudio de ratón. En la Figura 61 se muestran los resultados. A los ratones se les inyectó ADN plasmídico en las patas traseras y se usó electroporación para transferir el ADN en las células musculares el día 0. Este protocolo se había usado previamente con ADN pBRES e inductor MFP. Los días 7, 8, 9 y 10, los ratones recibieron compuesto inductor (solo vehículo, MFP o BLX-913) mediante inyección intraperitoneal (IP) en vehículo con aceite de sésamo a intervalos de 24 horas. Seis horas después de la última inyección el día 10, se extrajeron muestras de sangre de las venas de la cola de los ratones. Los niveles mSEAP en el suero se midieron para determinar el nivel de esta expresión indicadora después de inducción con los compuestos. Se extrajeron muestras de sangre adicionales antes de inyección de inductores el día 7, así como los días 18 y 25 para controlar la disminución de la expresión de mSEAP.

A partir de la Figura 61 es evidente que los ratones que recibieron pGT45 (RP original) respondieron bien a MFP y en cualquiera de las concentraciones 0,33 mg/kg o 1 mg/kg. Cuando se usó BLX-913 como inductor, estos ratones no respondieron a ninguna concentración. Cuando se administró el nuevo ADN de RP modificado por ingeniería genética a los ratones en los grupos pGT1048, respondieron a BLX-913 mejor que los ratones que recibieron el ADN de pGT45.

#### Ejemplo 12: Generación de vectores adicionales

##### Mutagénesis de LPB de RP pBRES

Se construyeron mutantes dirigidos por mutagénesis QuikChange de plásmidos pBRES y se confirmó por secuenciación. Los plásmidos pGT77-80 (pGT1044-1046, pGT1017 para mutación de LBD V729L/W755A) contienen las cuatro orientaciones de los casetes pBRES-luciferasa, pGT44-47 (pGT1047-1050 para la mutación de LBD V729L/W755A) contienen las cuatro orientaciones de los casetes pBRESmSEAP y pGT27-30 (pGT1055-pGT1058 para la mutación de LBD V729L/W755A) contienen las cuatro orientaciones de los casetes pBRES-hlFNb. Las orientaciones respectivas pueden obtenerse a partir de las Figuras 58-60.

Cebadores usados para la mutagénesis dirigida:

5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTG CCC AAC TAG GCG AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG GGC AAG ACT TGT CAG CAA AG -3' (N719A);

5'- CTT TGC TGA CAA GTC TTG GCC AAC TAG GCG AGA GG -3' y 5'- CCT CTC GCC TAG TTG GCC AAG ACT TGT CAG CAA AG -3' (N719G);

5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTT TCA TGA GCT TAA TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT GAA AGA ATA CTG AAT GAG AG -3' (W755F);

5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTC TGA TGA GCT TAA TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT CAG AGA ATA CTG AAT GAG AG -3' (W755L);

5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTG TGA TGA GCT TAA TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT CAC AGA ATA CTG AAT GAG AG -3' (W755V);

5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTG CCA TGA GCT TAA TGG TG -3' y 5'- CAC

CAT TAA GCT CAT GGC AGA ATA CTG AAT GAG AG -3' (W755A);

5'- CTC TCA TTC AGT ATT CTG GCA TGA GCT TAA TGG TG -3' y 5'- CAC CAT TAA GCT CAT GCC AGA ATA CTG AAT GAG AG -3' (W755G);

5'- GAG GCA ACT TCT TTC AGG CGT CAA GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG CCT GAA AGA AGT TGC CTC -3' (V729G);

5'- GAG GCA ACT TCT TTC AGC CGT CAA GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG GCT GAA AGA AGT TGC CTC -3' (V729A);

5'- GAG GCA ACT TCT TTC ACT GGT CAA GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACC AGT GAA AGA AGT TGC CTC -3' (V729L);

5'- GAG GCA ACT TCT TTC ATT CGT CAA GTG GTC TAA ATC -3' y 5'- GAT TTA GAC CAC TTG ACG AAT GAA AGA AGT TGC CTC -3' (V729F).

Una realización de la invención es un vector del grupo pGT77, pGT78, pGT79, pGT1044, pGT1045, pGT1017, pGT1046, pGT44, pGT45, pGT46, pGT47, pGT1047, pGT1048, pGT1049, pGT1050, pGT27, pGT28, pGT29, pGT30, pGT1055, pGT1056, pGT1057 y pGT1058.

Una realización adicional es el uso de un vector del grupo pGT77, pGT78, pGT79, pGT1044, pGT1045, pGT1017, pGT1046, pGT44, pGT45, pGT46, pGT47, pGT1047, pGT1048, pGT1049, pGT1050, pGT27, pGT28, pGT29, pGT30, pGT21055, pGT1056, pGT1057 y pGT1058 para cualquier propósito descrito en el presente documento, en particular para el uso en un sistema de expresión regulado de la invención. Además una realización de la invención es un vector del grupo pGT77, pGT78, pGT79, pGT1044, pGT1045, pGT1017, pGT1046, pGT44, pGT45, pGT46,

pGT47, pGT1047, pGT1048, pGT1049, pGT1050, pGT27, pGT28, pGT29, pGT30, pGT1055, pGT1056, pGT1057 y pGT1058 como parte de un sistema de expresión regulado de la invención.

5 También es parte de la invención un sistema de expresión regulado de la invención que comprende un vector del grupo pGT77, pGT78, pGT79, pGT1044, pGT1045, pGT1017, pGT1046, pGT44, pGT45, pGT46, pGT47, pGT1047, pGT1048, pGT1049, pGT1050, pGT27, pGT28, pGT29, pGT30, pGT1055, pGT1056, pGT1057 y pGT1058, en el que el activador se selecciona del grupo que consiste en un modulador de RP modificado, un análogo del ligando de RP, una antiprogestina modificada, una mesoprogestina modificada, una progestina modificada, una MFP modificada, un asoprinil modificado, BLX-93, BLX-899, BLX-952, BLX-610, BLX-117, BLX-784 o BLX-913.

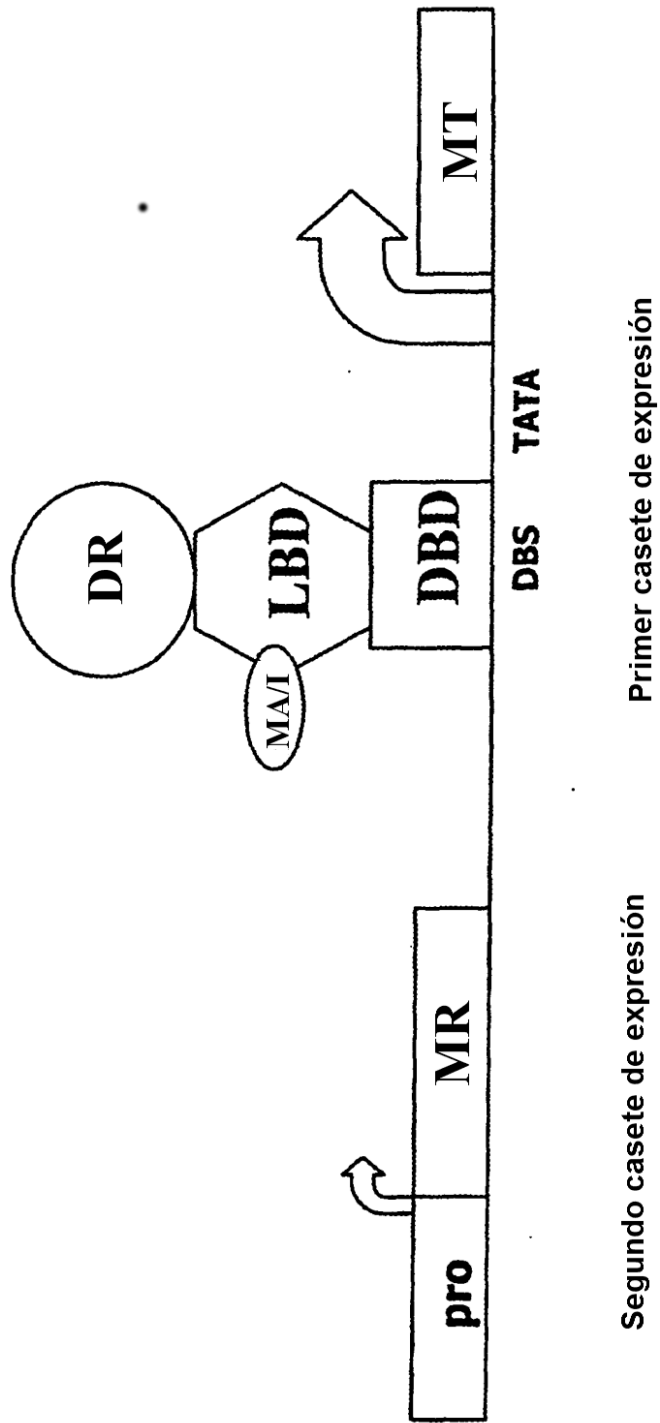
10 Un experto en la materia apreciará fácilmente que las composiciones y procedimientos de la presente invención se adaptan bien para realizar los objetos y obtener las finalidades y ventajas descritas en el presente documento, así como cualquiera que sea intrínseca en la presente invención. Los expertos en la técnica producirán cambios en las composiciones y procedimientos de la presente invención, y otros usos.



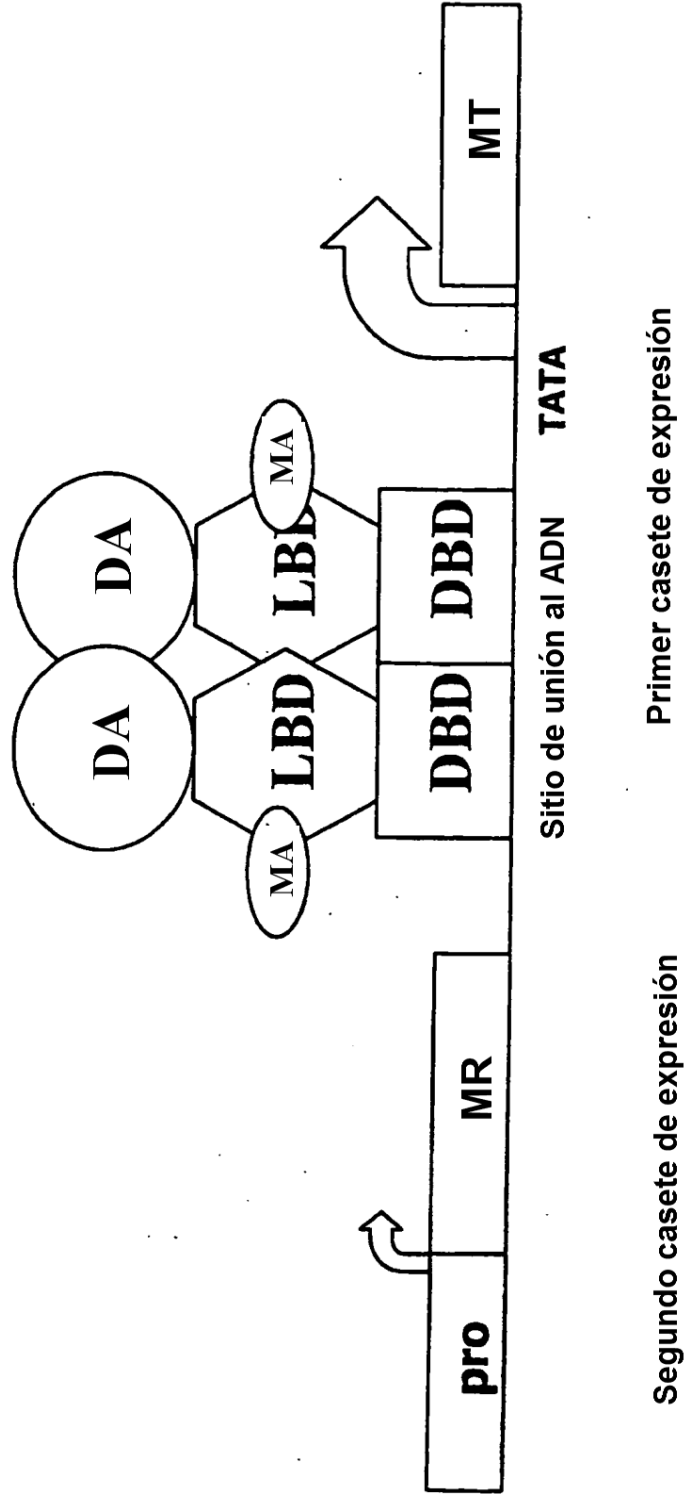
**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema de expresión regulado que comprende al menos un vector y una molécula activadora (MA), comprendiendo dicho vector:
- 5 un primer casete de expresión que comprende: i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula terapéutica (MT) que tiene una actividad terapéutica y ii) un primer promotor y un primer sitio poli(A) unido operativamente a dicha primera secuencia de ácido nucleico, en el que dicha MT puede expresarse en células de un sujeto, y dicha expresión o actividad de MT es dependiente de la dosis y está regulada o inducida en presencia de una molécula reguladora (MR); y un segundo casete de expresión que comprende: i) una
- 10 segunda secuencia de ácido nucleico que codifica dicha molécula reguladora (Rlv)<sup>7</sup> y ii) un segundo promotor y un segundo sitio poli(A) unido operativamente a dicha segunda secuencia de ácido nucleico, en el que dicha MR puede expresarse en dichas células y activarse en presencia de una molécula activadora (MA), regulando de esta manera dicha expresión o actividad de MT, y en el que dicha MA es un modulador de receptor de esteroide modificado que es una mifepristona modificada (MFP), en el que dicha mifepristona modificada es un anillo sustituido 11-beta seleccionado del grupo que consiste en BLX-913, BLX-899, BLX-952, BLX-61 0, BLX-117 y
- 15 BLX-784 y tiene un efecto escaso o limitado sobre hPR humano.
2. El sistema de expresión regulado de la reivindicación 1, en el que dicho vector puede administrarse poniendo en contacto dichas células con dicho vector *in vivo* o *ex vivo*.
3. Una composición farmacéutica que comprende al menos un sistema de expresión de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 4. Un kit para administrar una molécula terapéutica (MT) a las células de un sujeto, comprendiendo dicho kit al menos un sistema de expresión regulado de acuerdo con la reivindicación 1 e instrucciones para su uso.

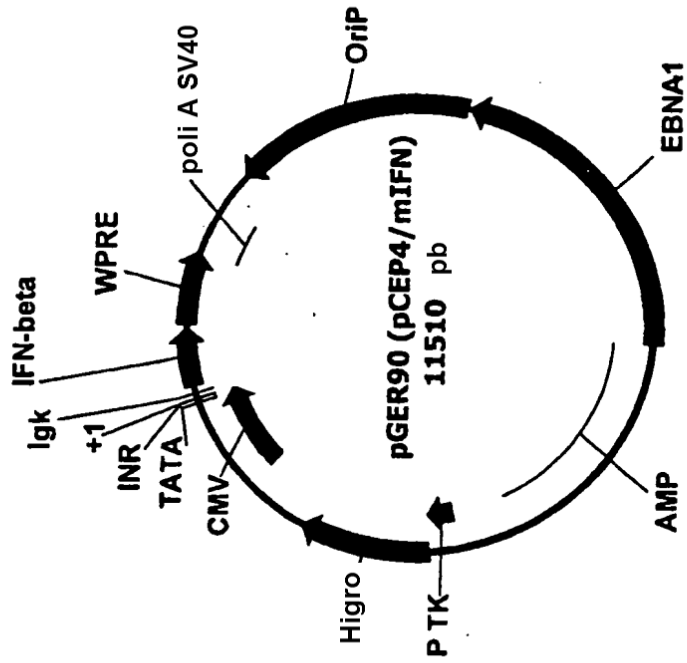
FIG. 1A



**FIG. 1B**



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**

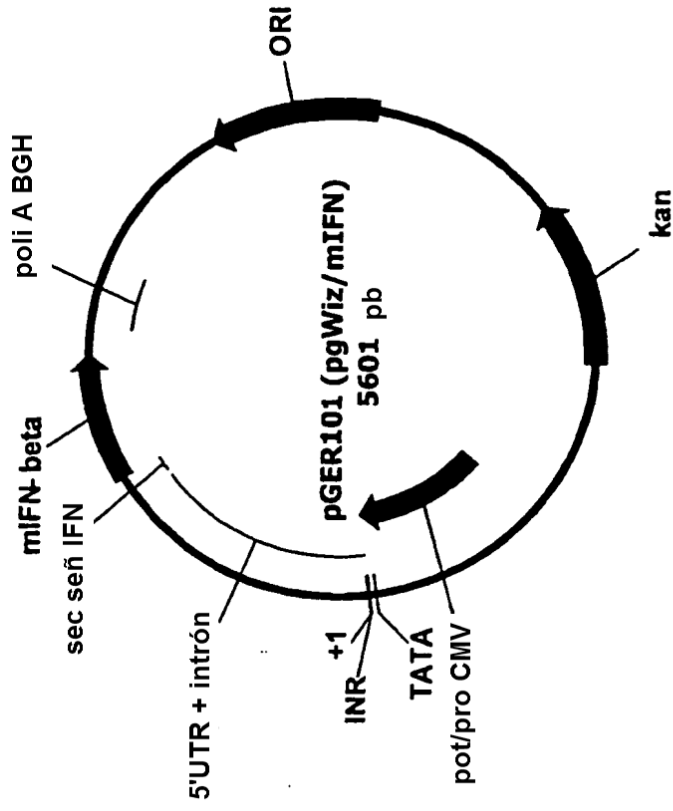


FIG. 2D

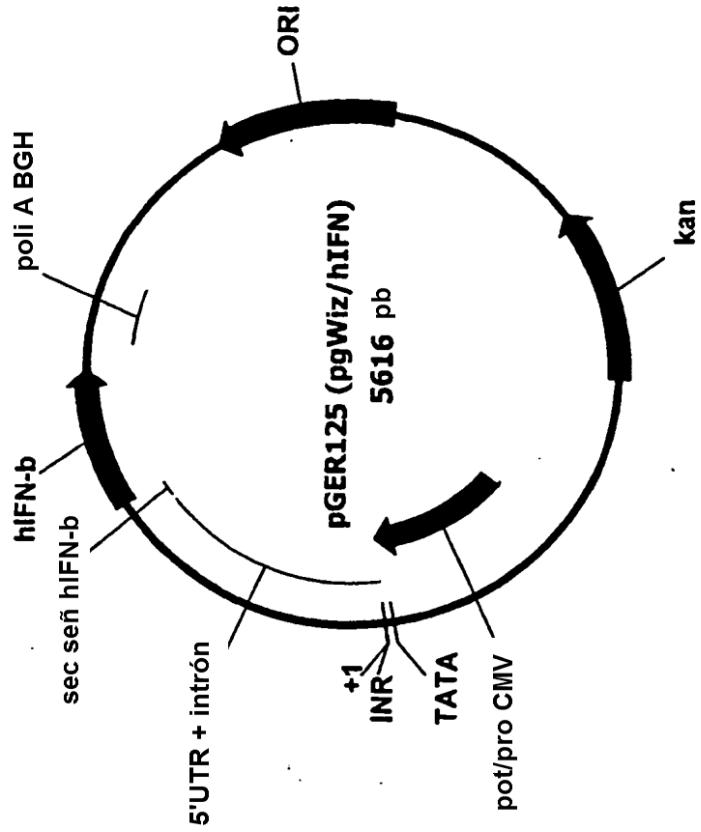


FIG. 2C

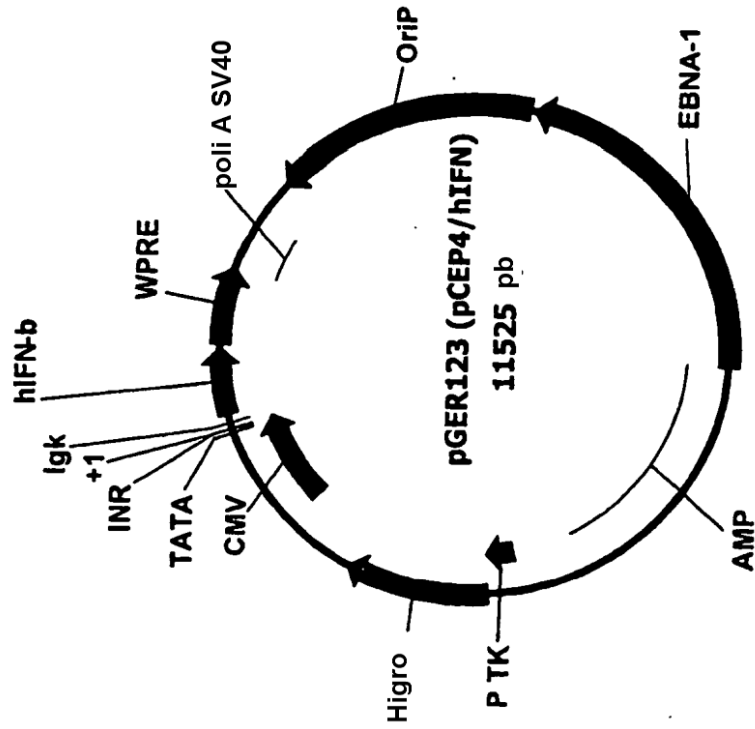


FIG. 3

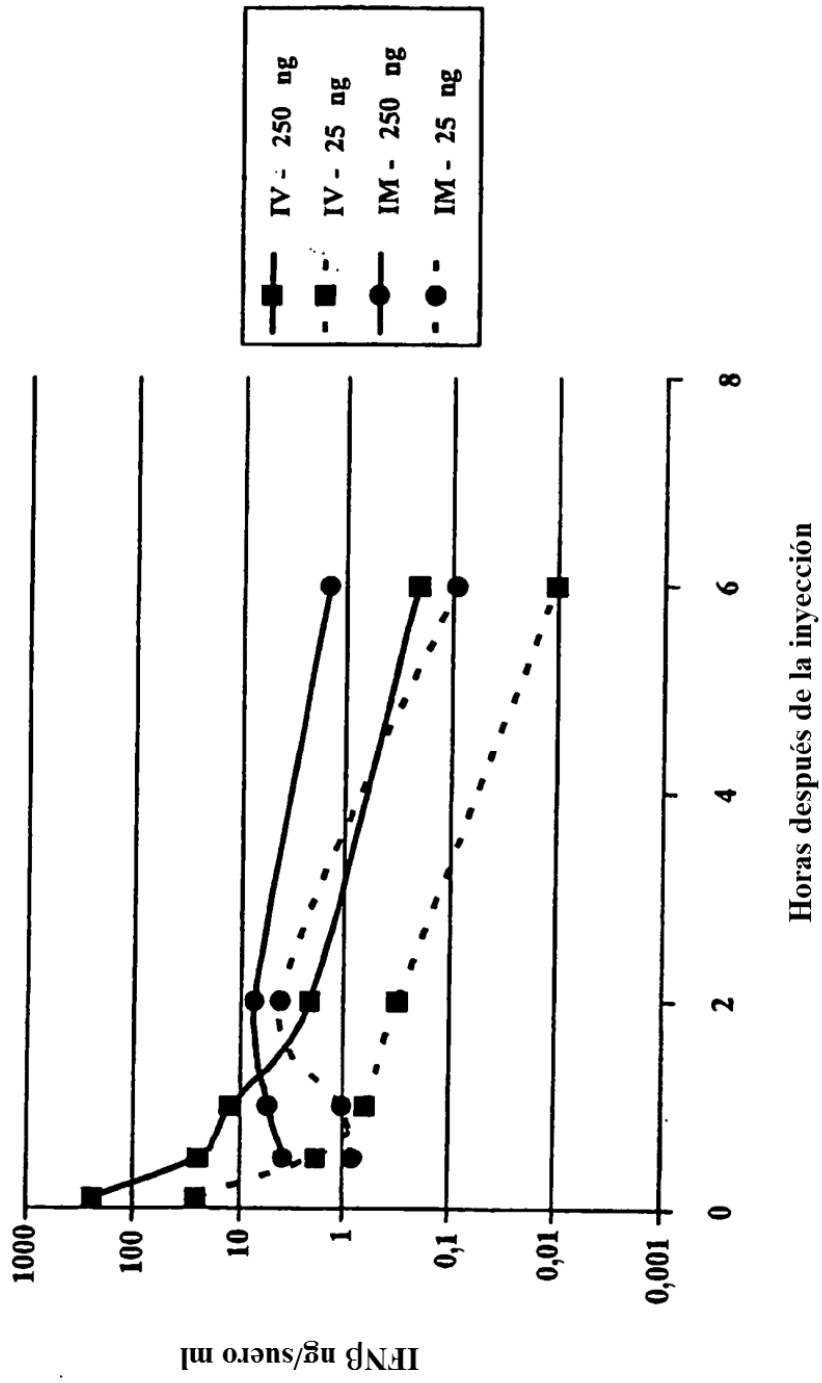
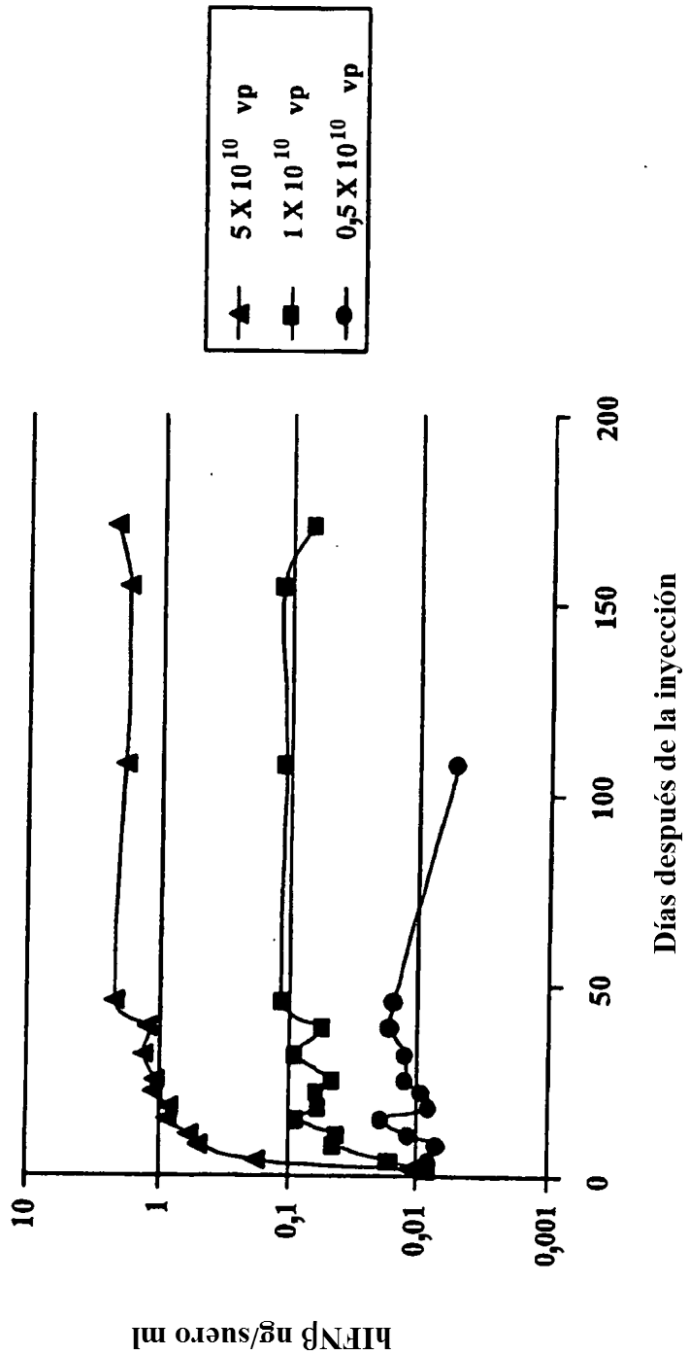
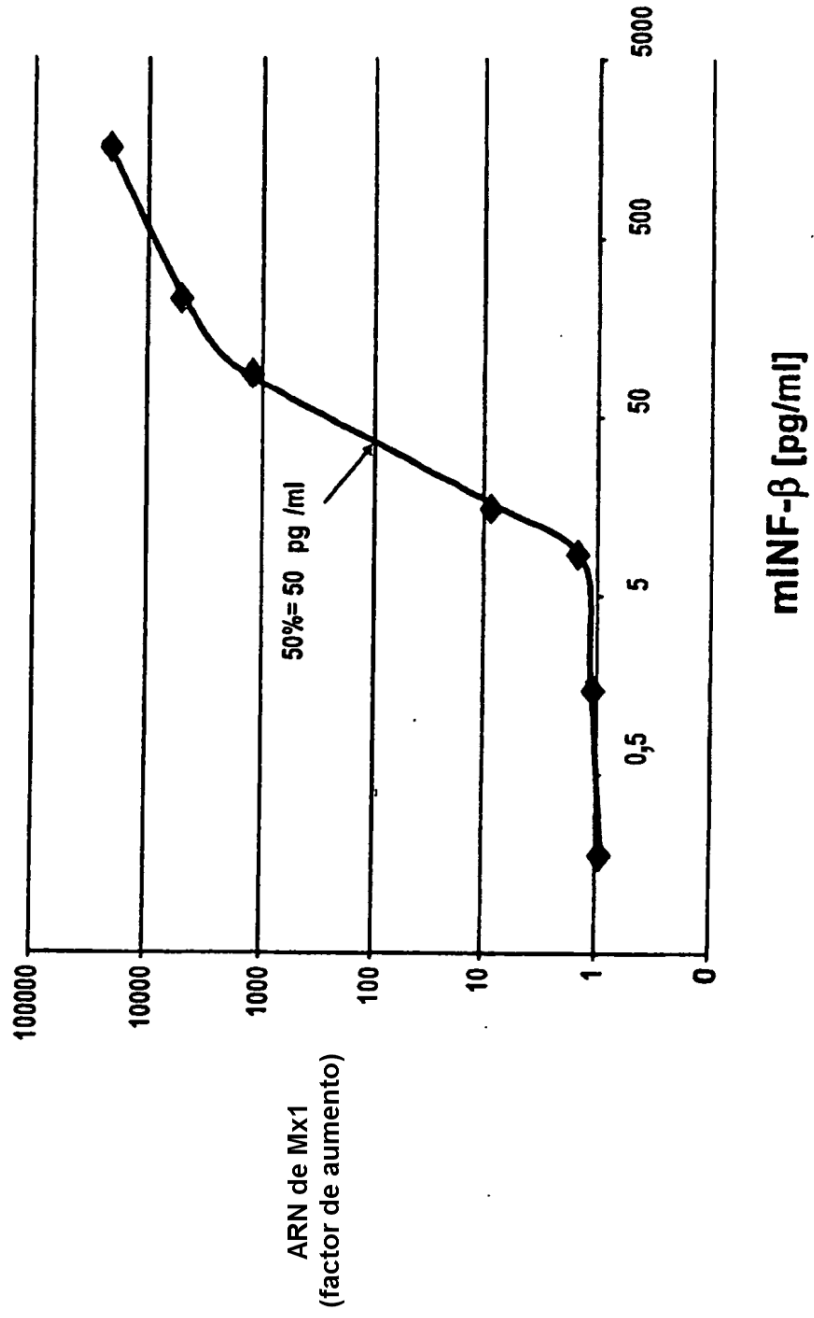


FIG. 4

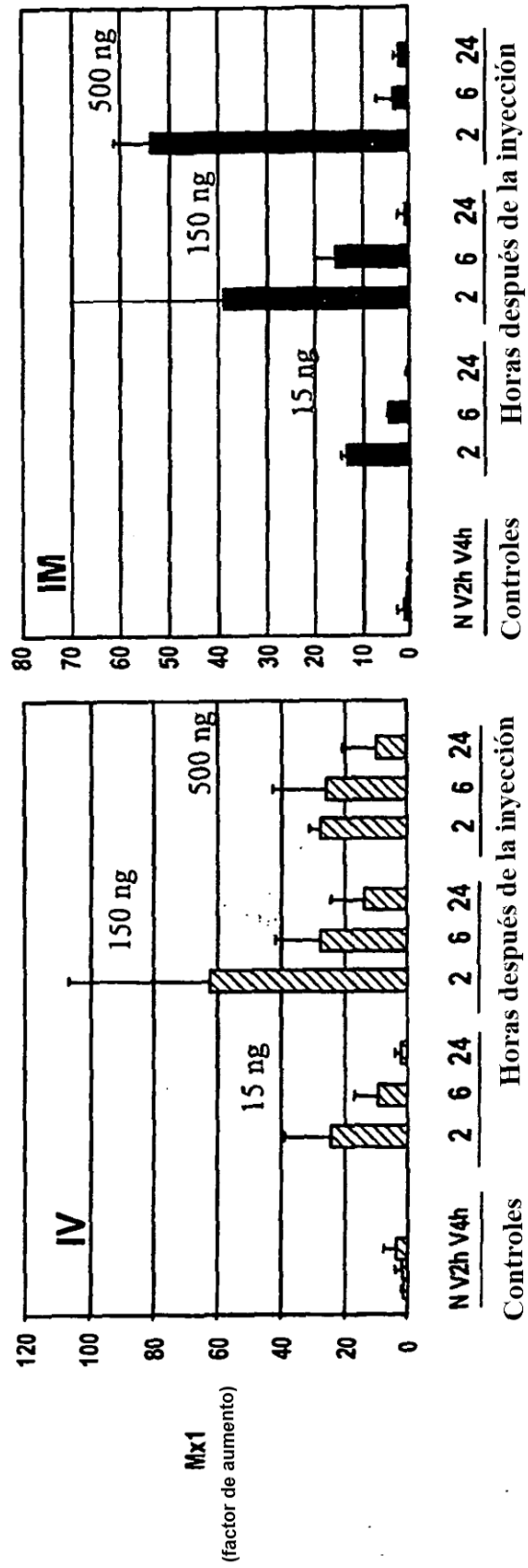


**FIG. 5**





**FIG. 6**



**FIG. 7A**

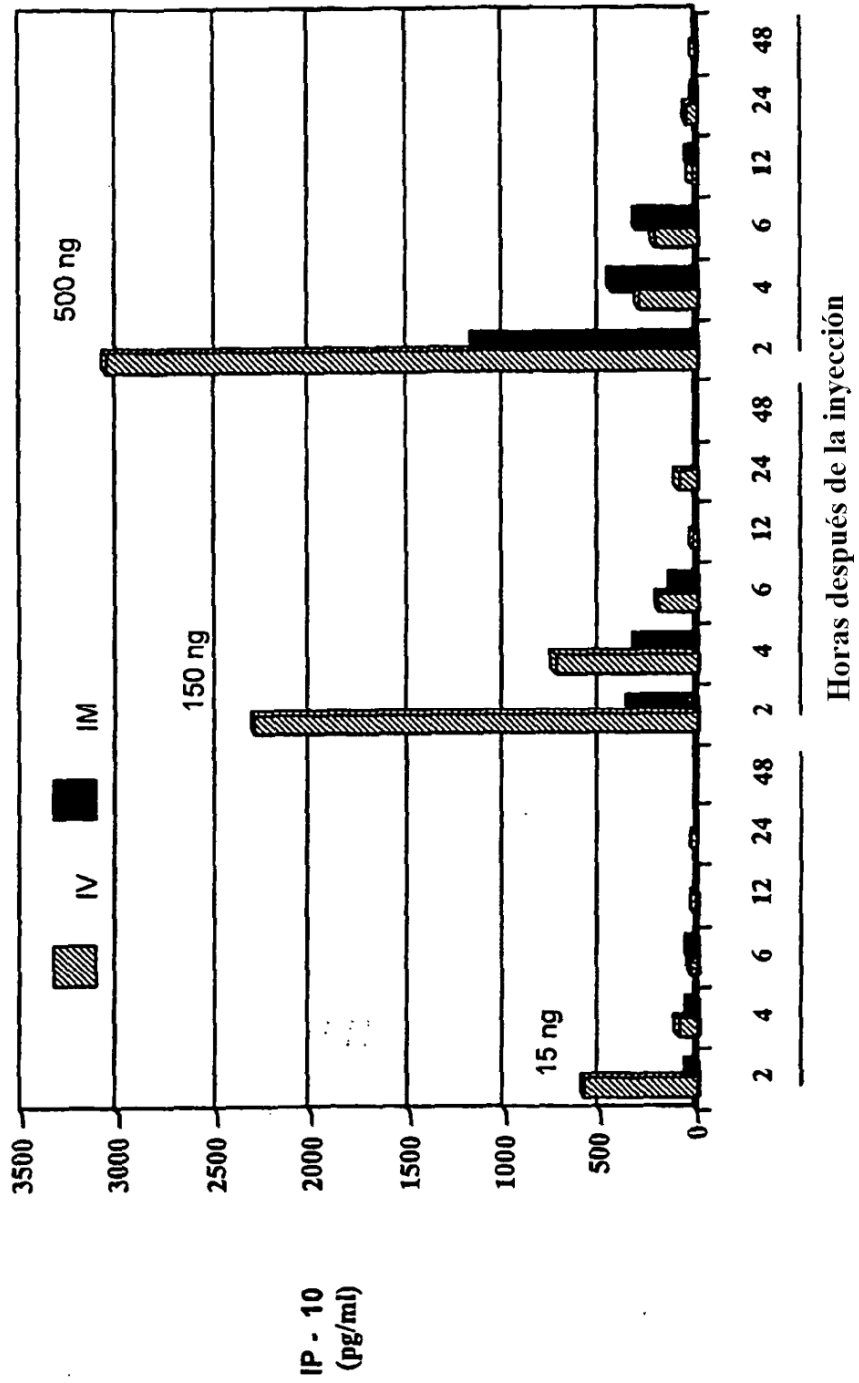


FIG. 7B

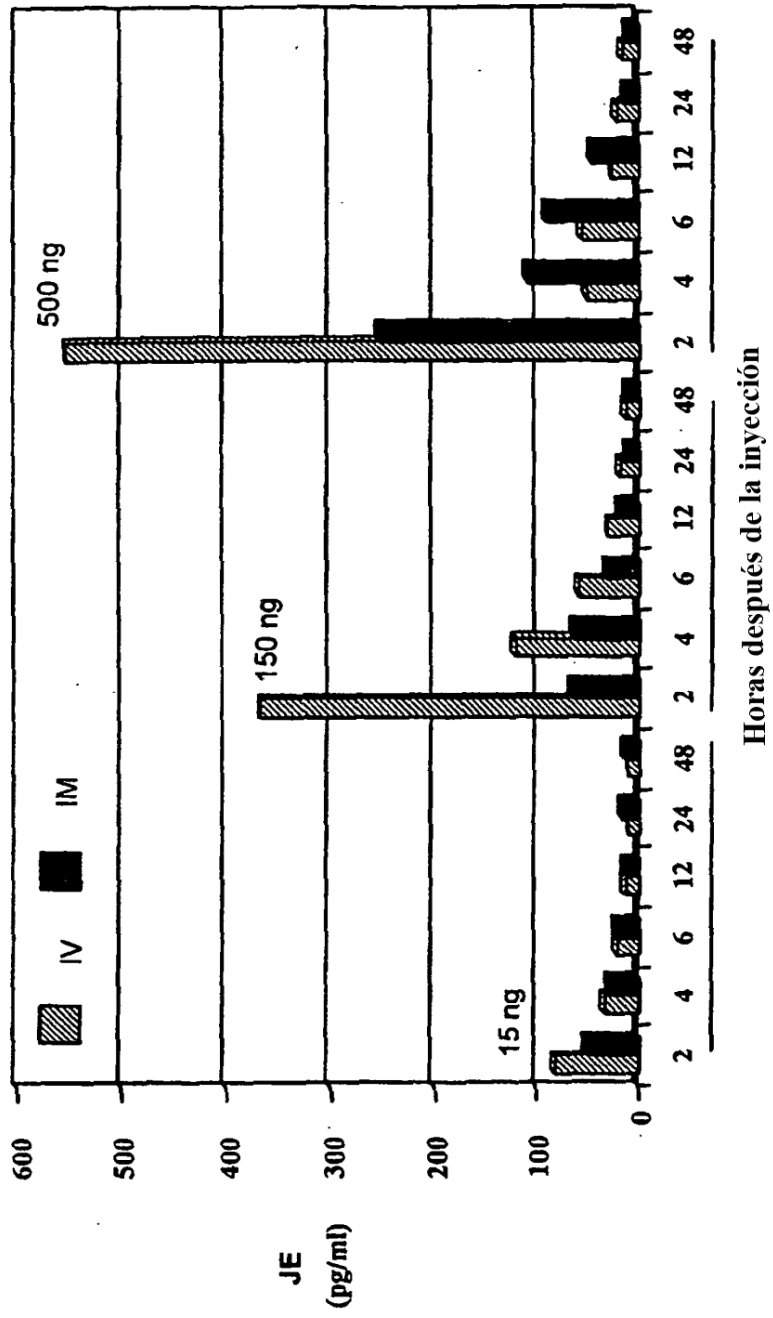


FIG. 8

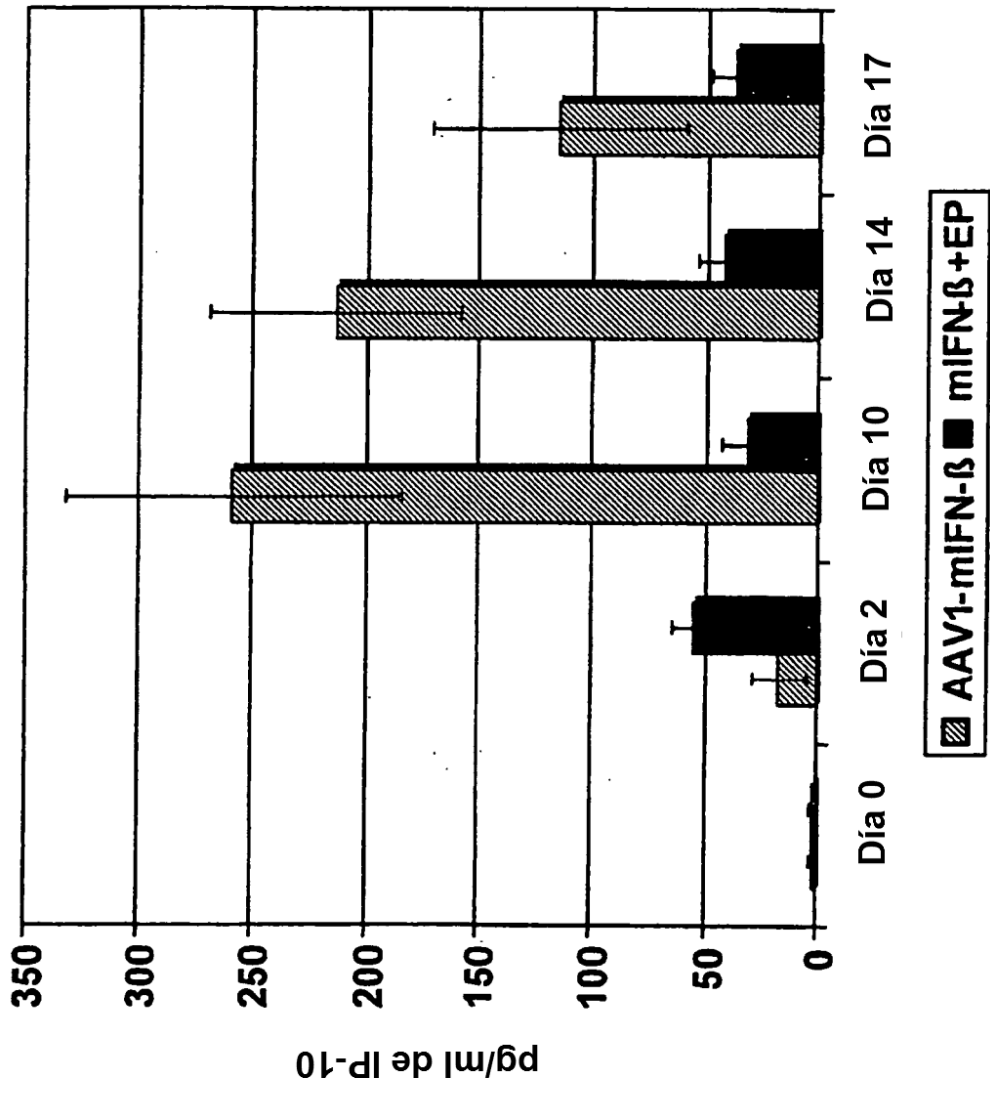
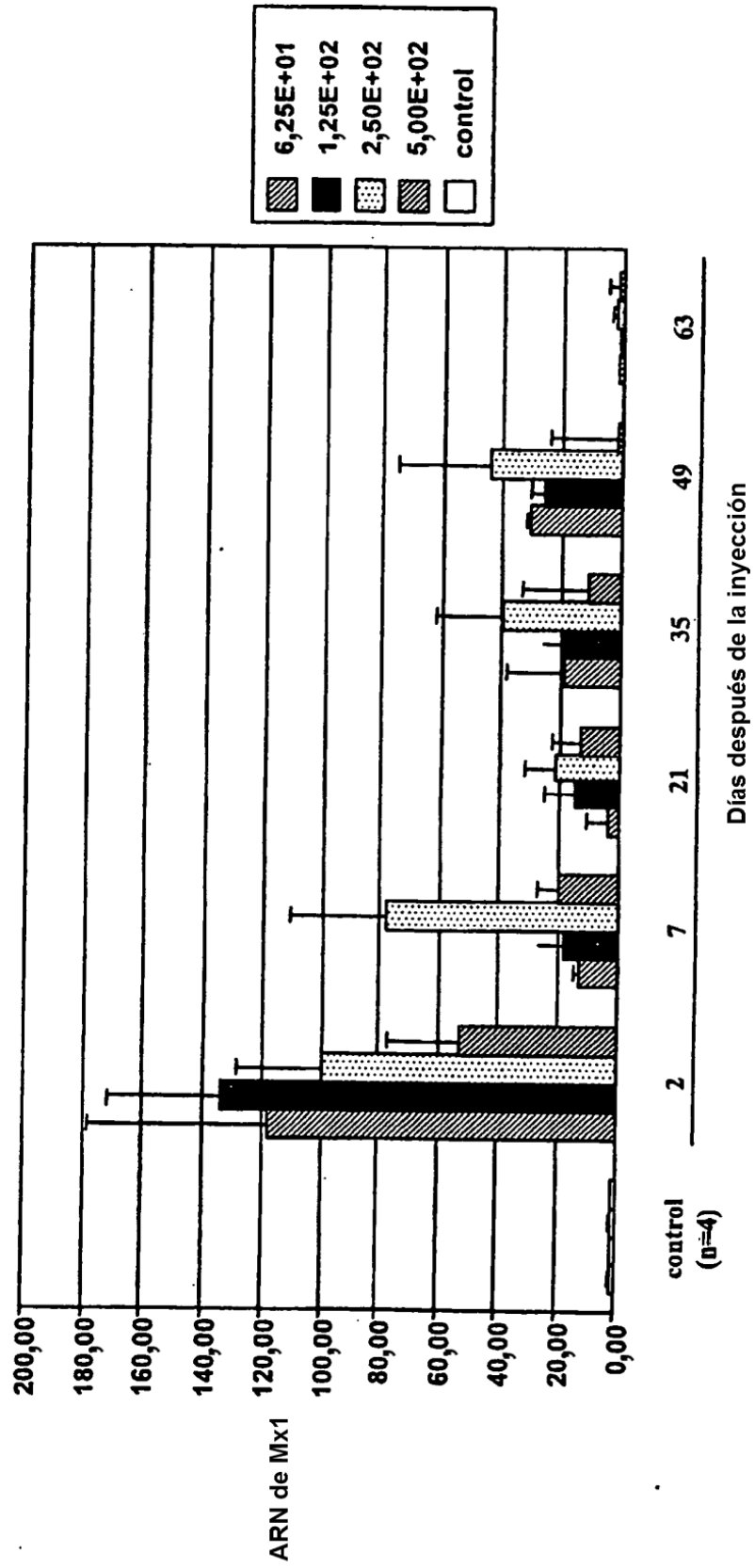
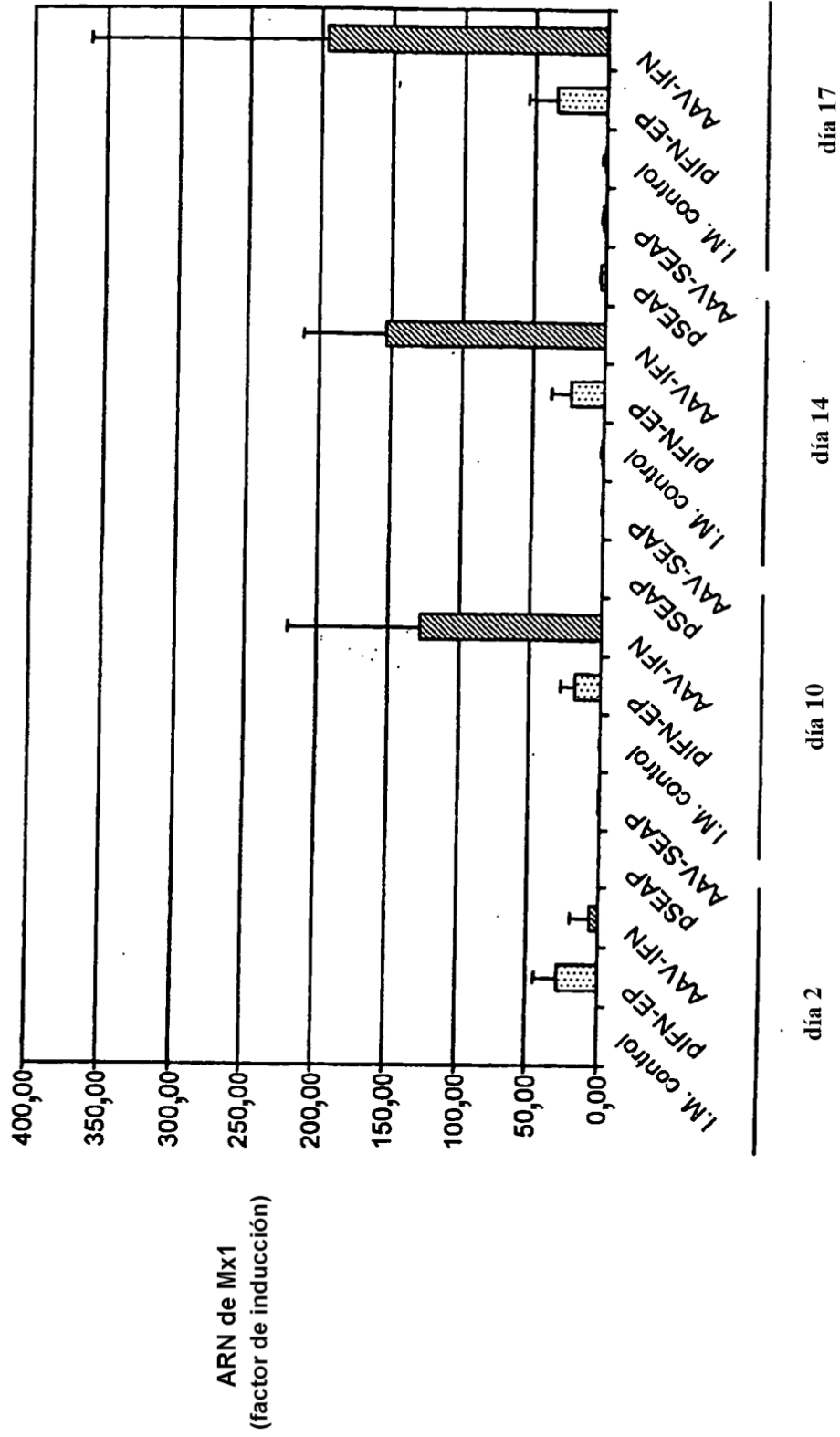


FIG. 9



**FIG. 10**



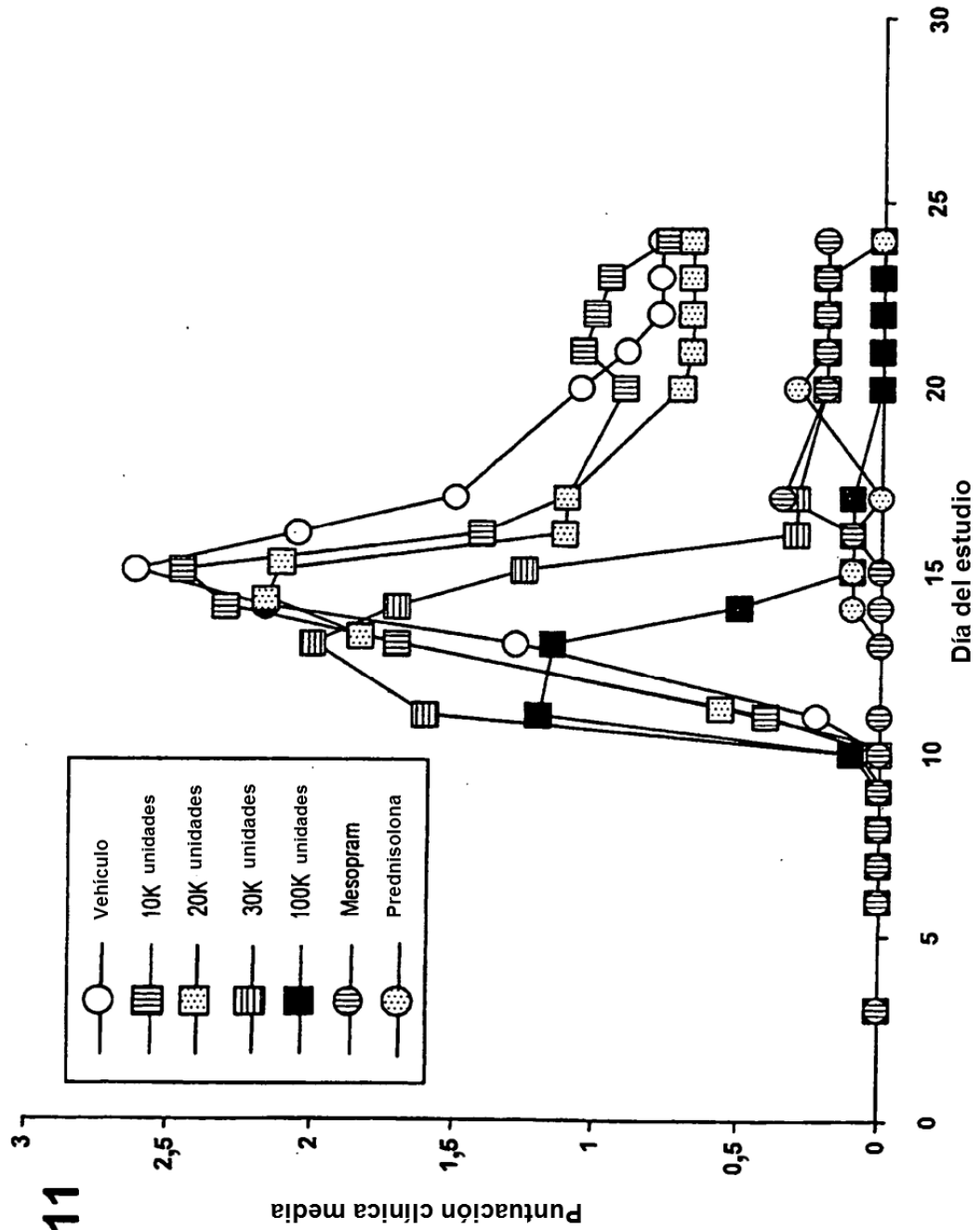


FIG. 11

**FIG. 12**

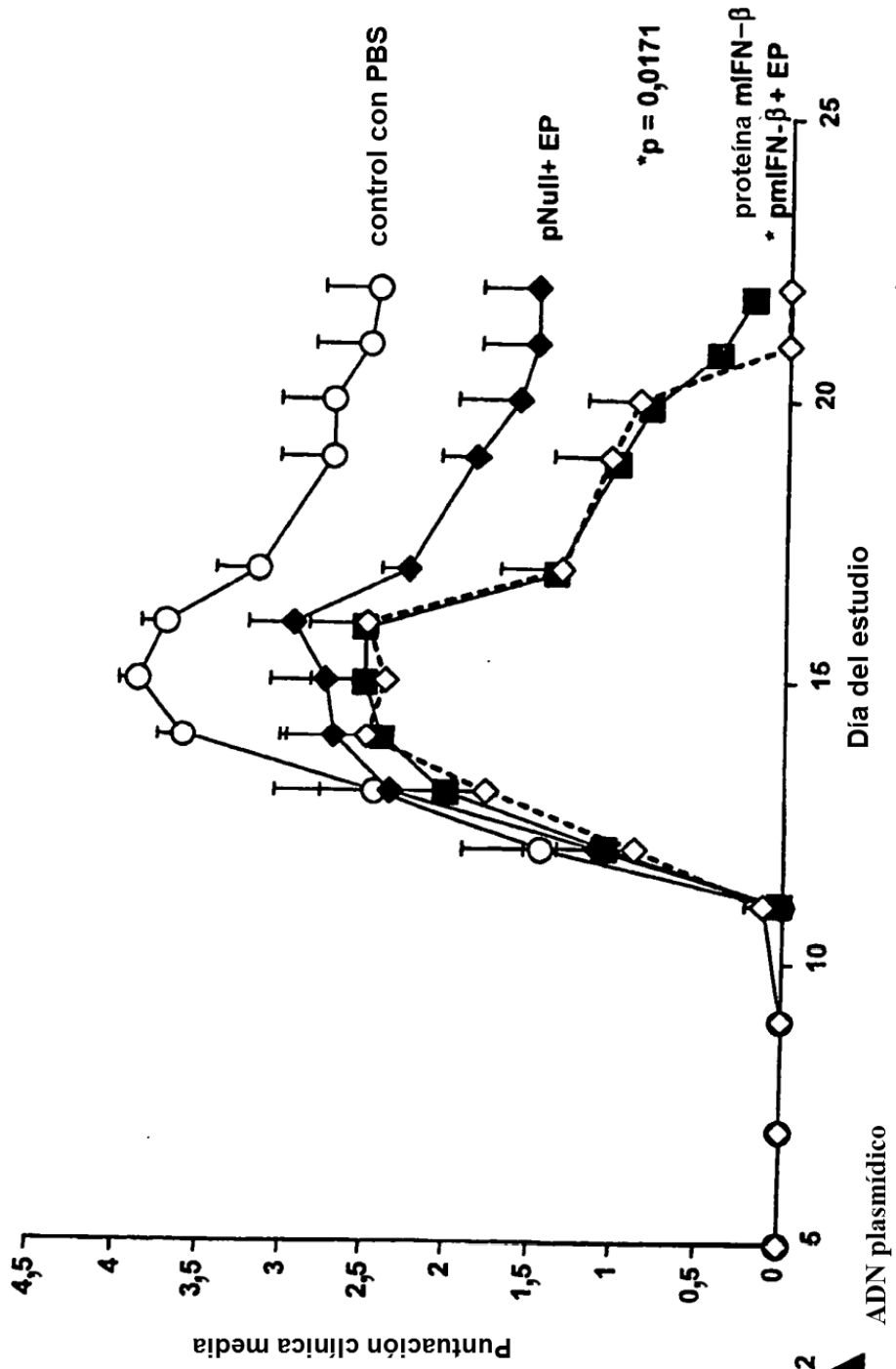
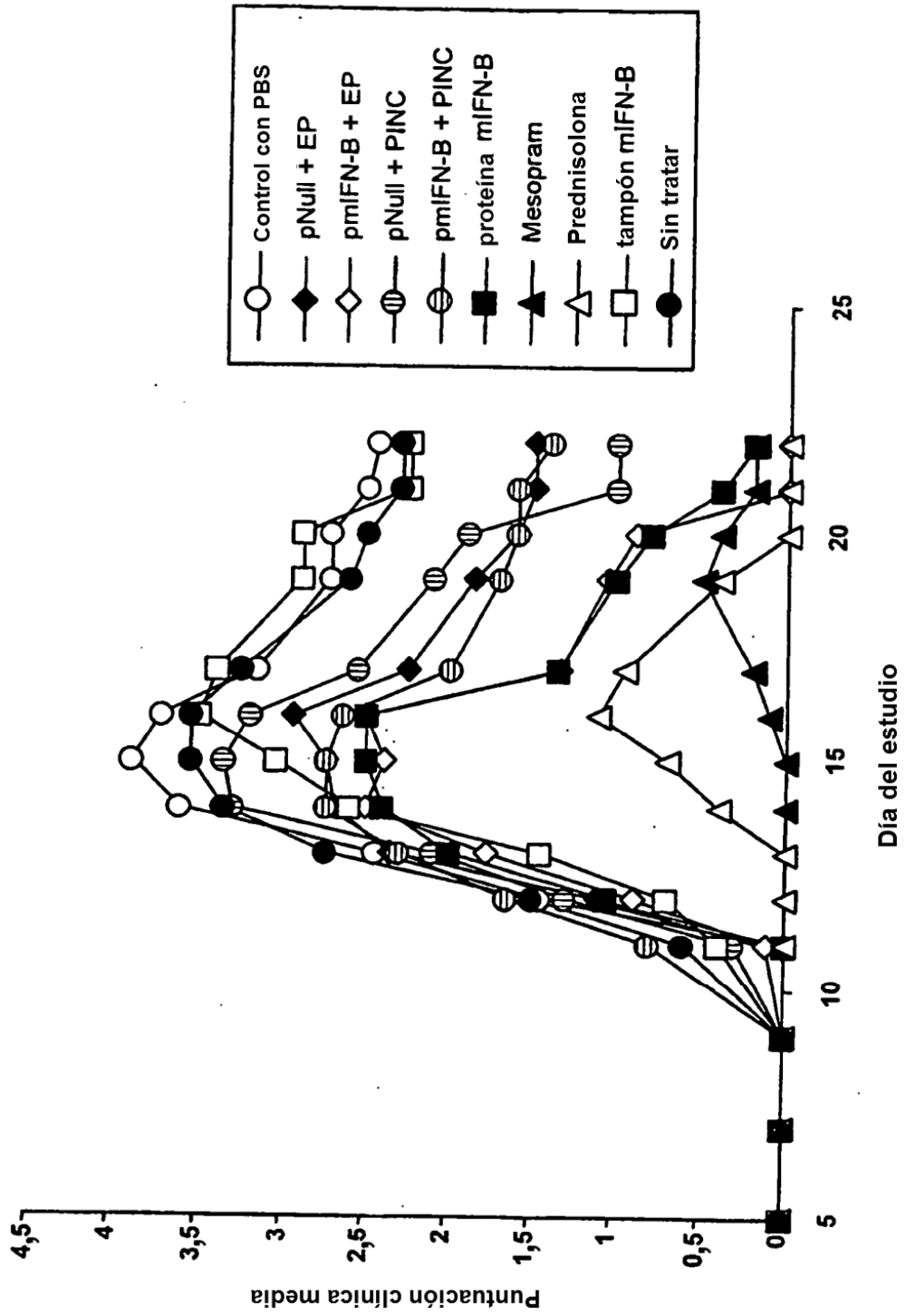
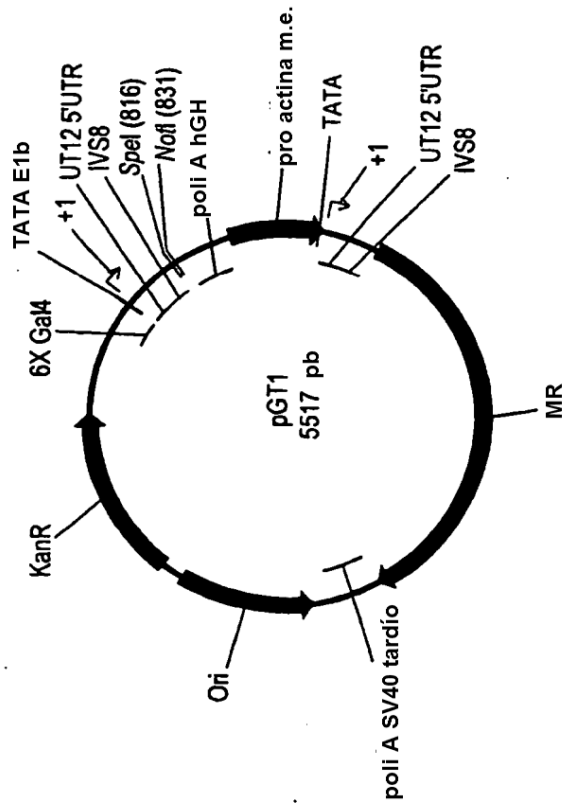




FIG. 13



**FIG. 14A**



**FIG. 14B**

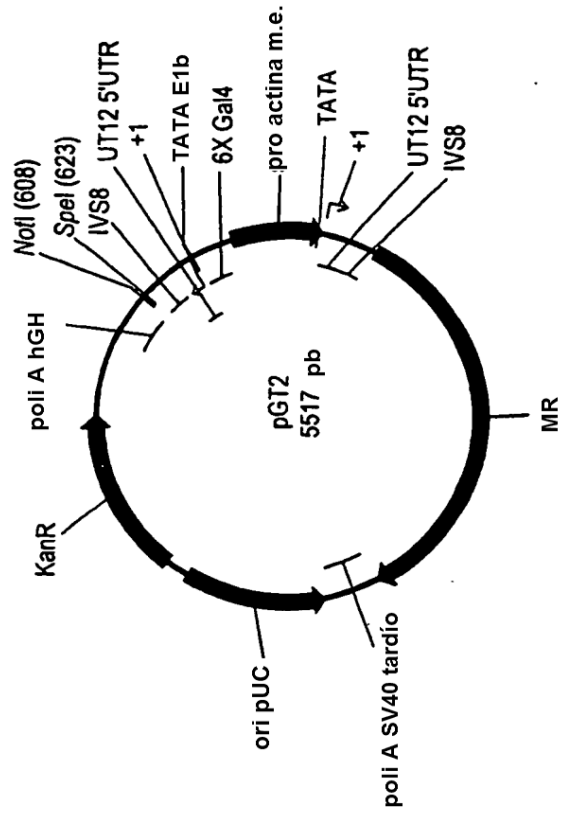


FIG. 14D

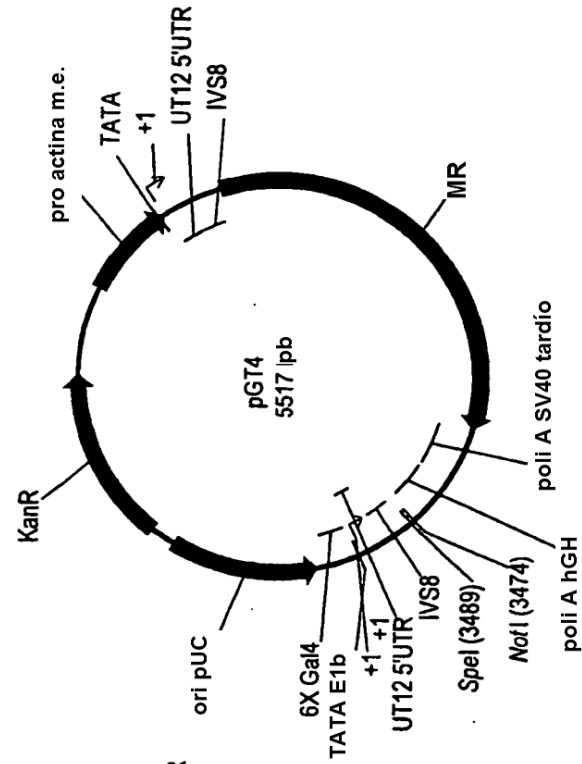
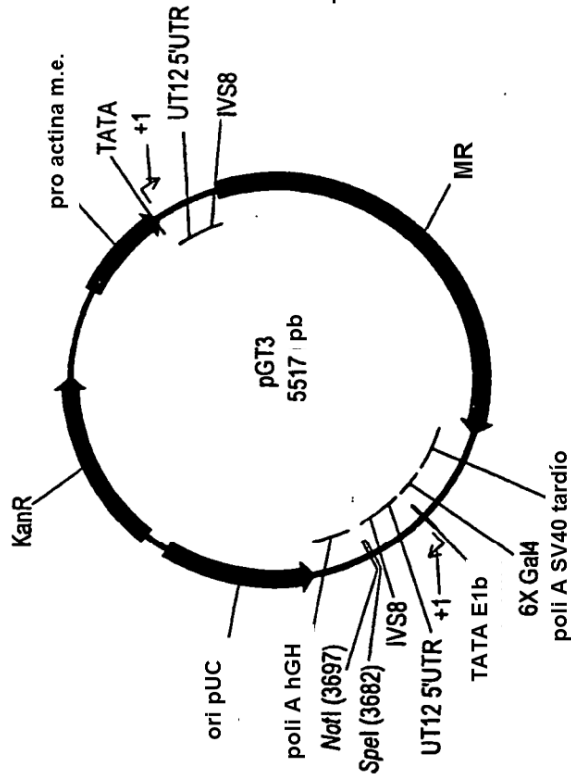
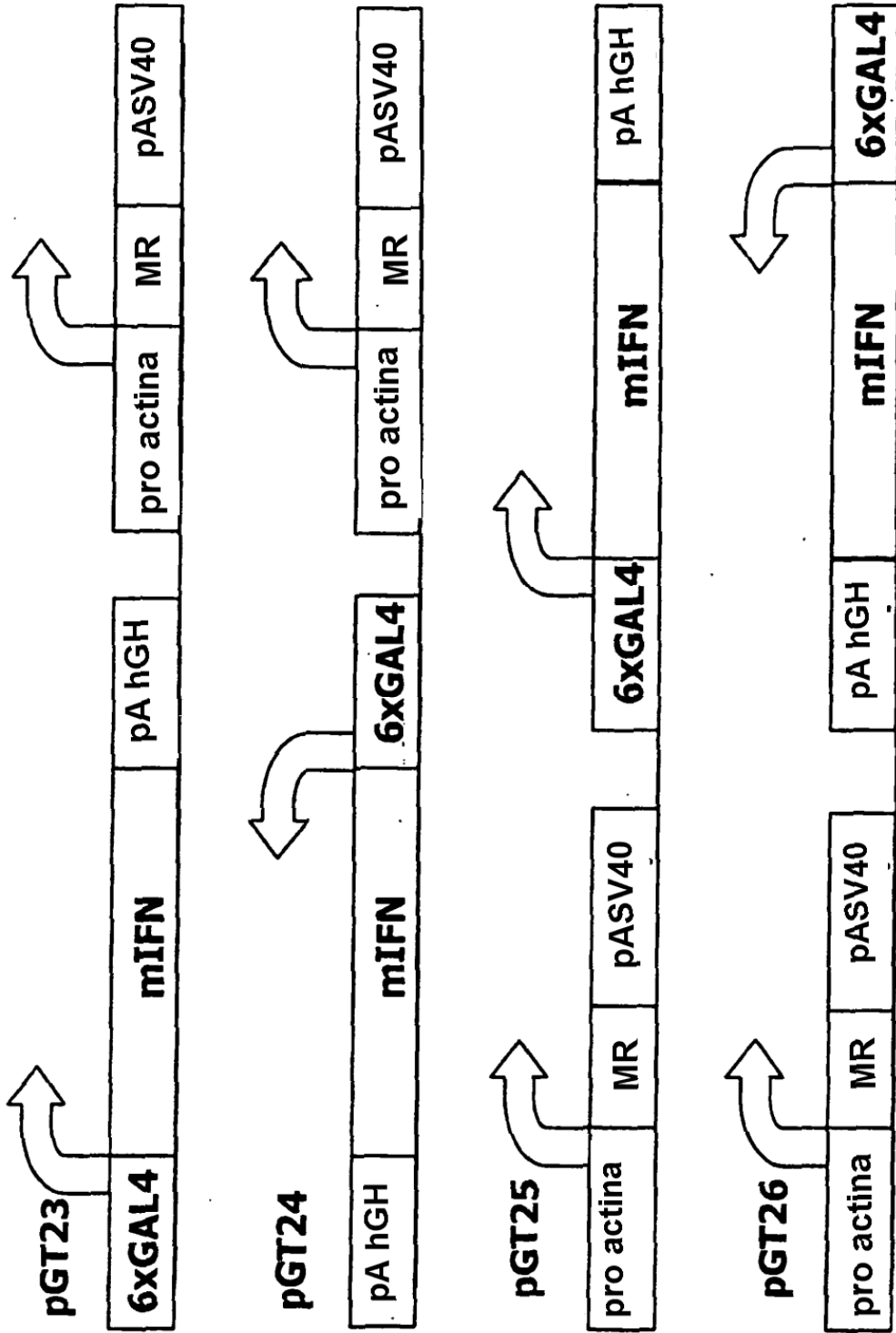


FIG. 14C



**FIG. 15A**



**FIG. 15B**

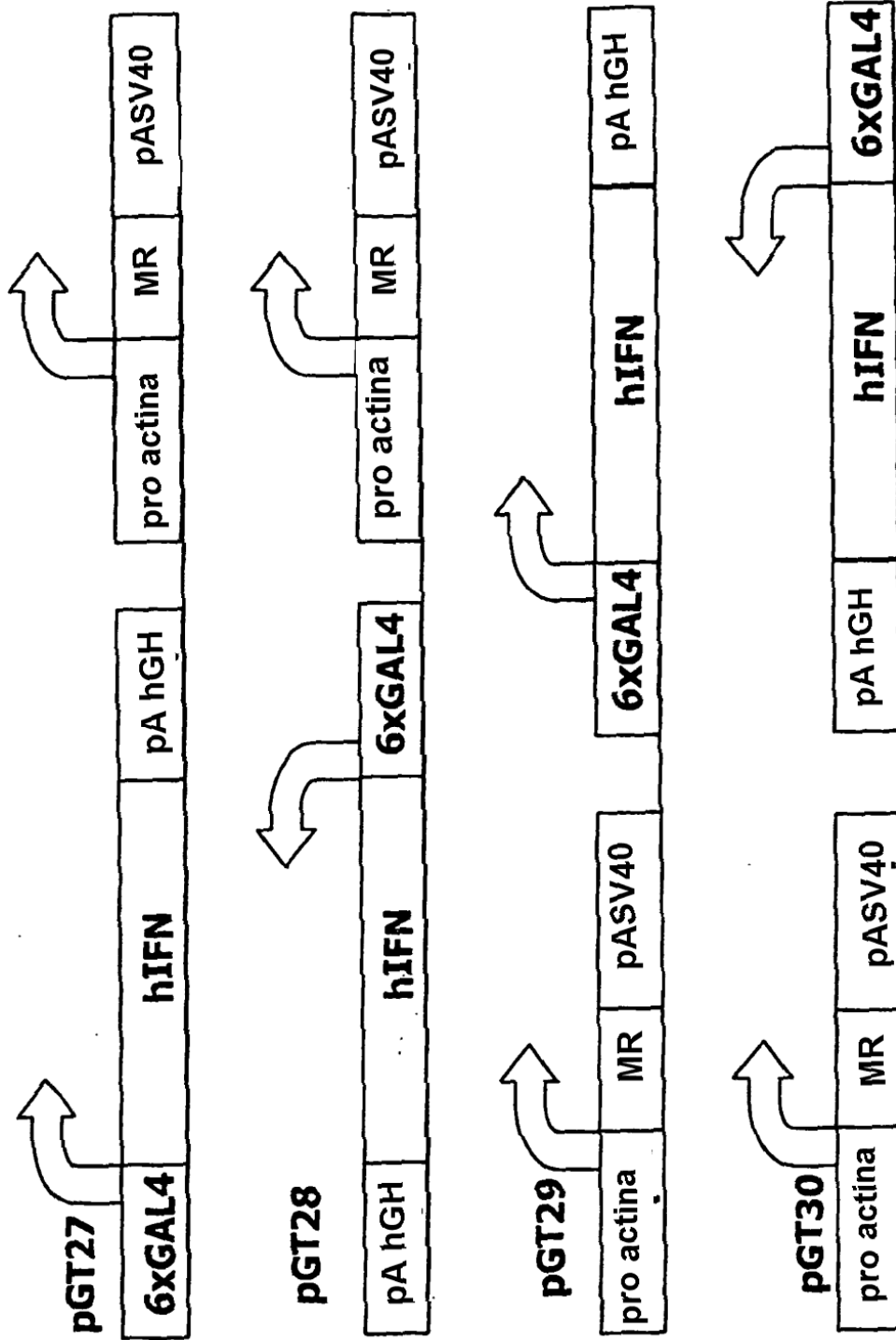


FIG. 16

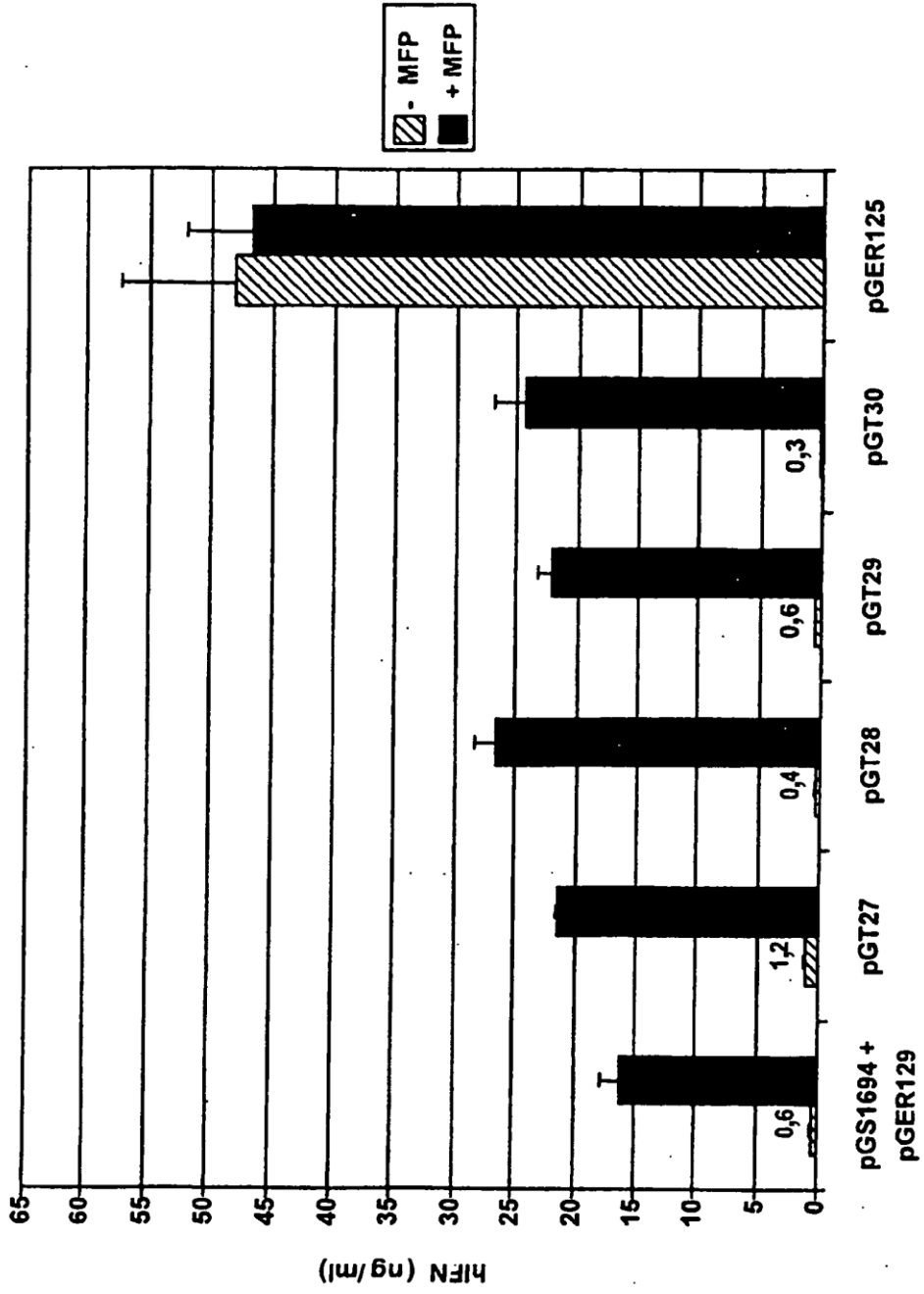
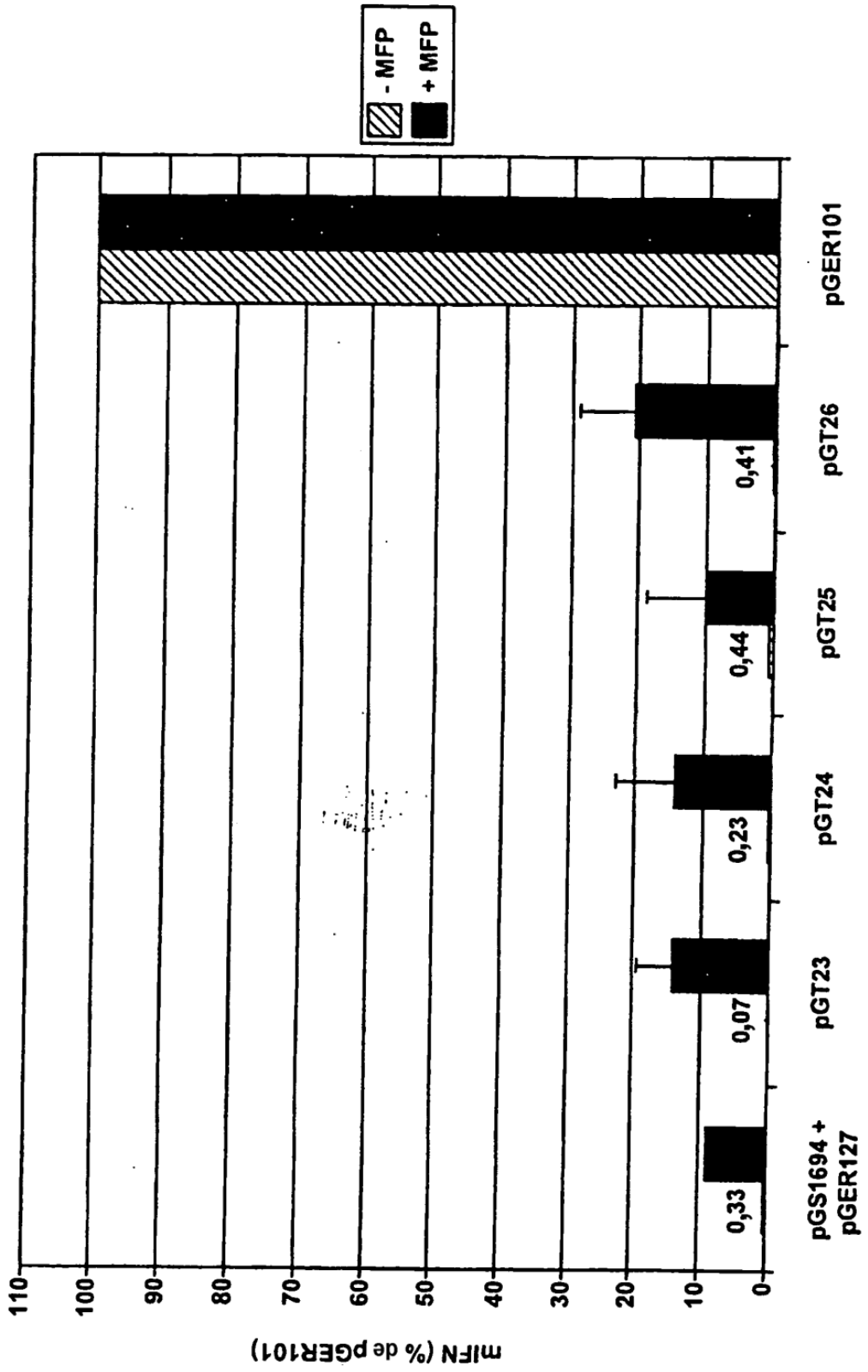
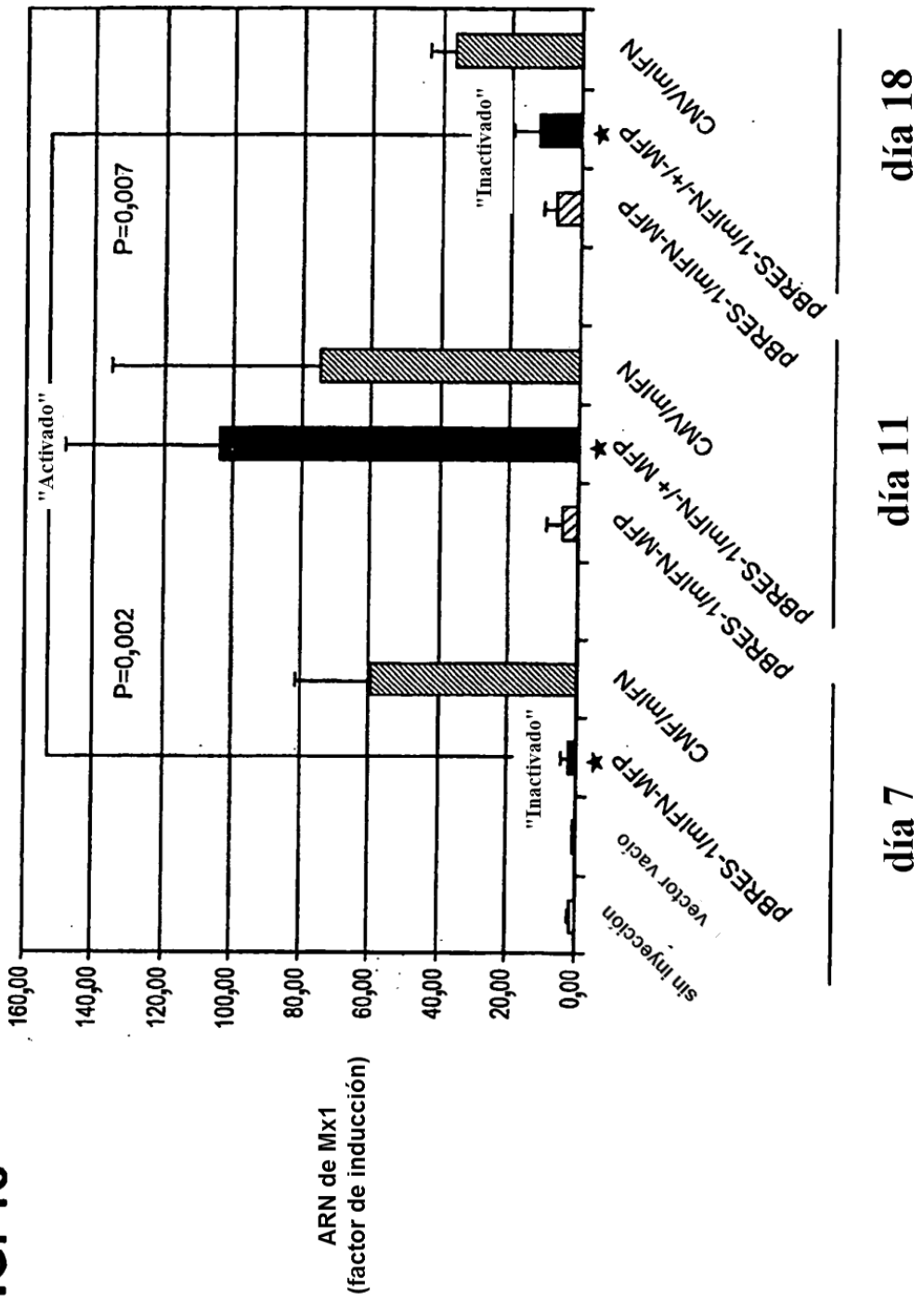


FIG. 17



**FIG. 18**





**FIG. 19**

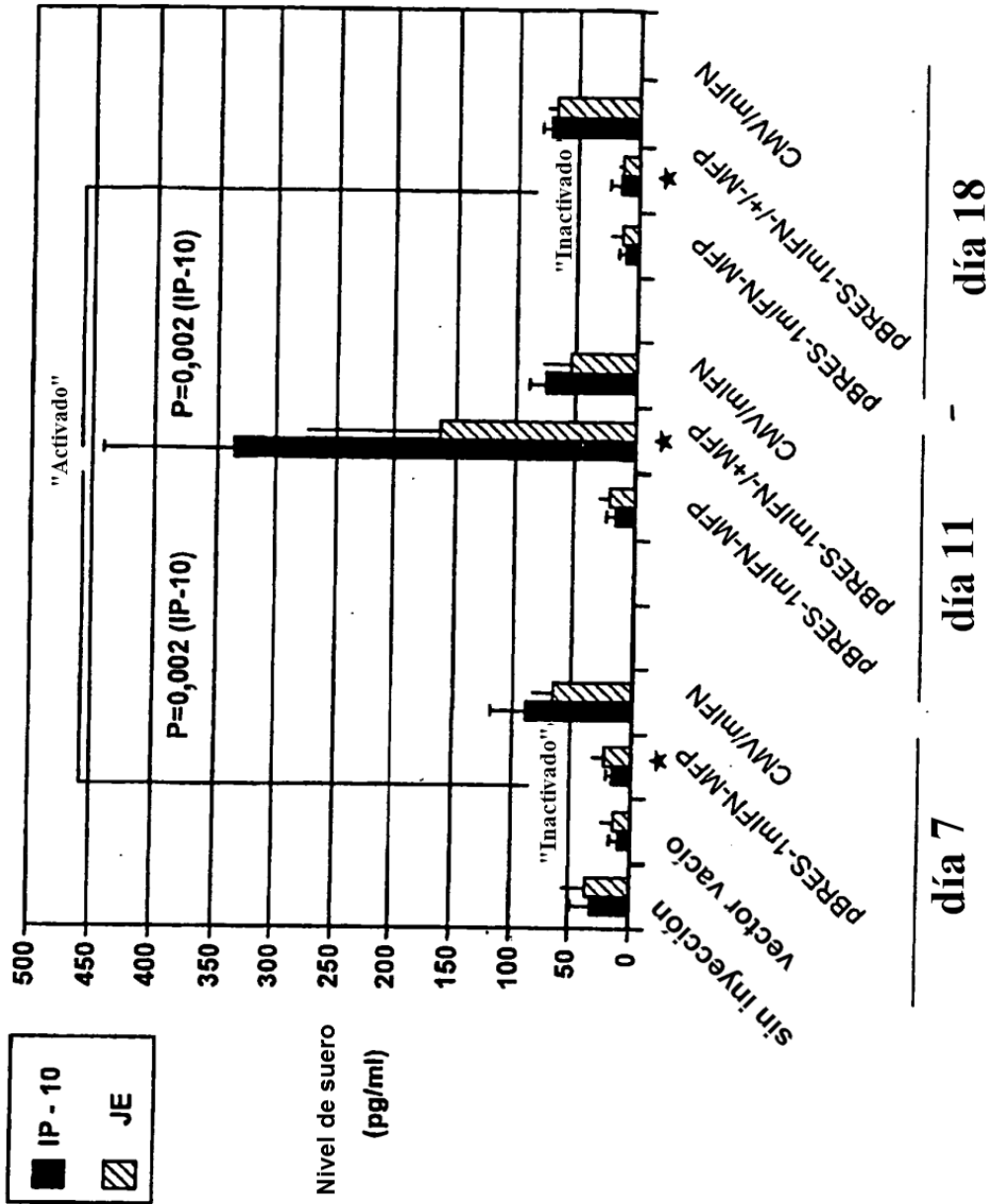


FIG. 20A

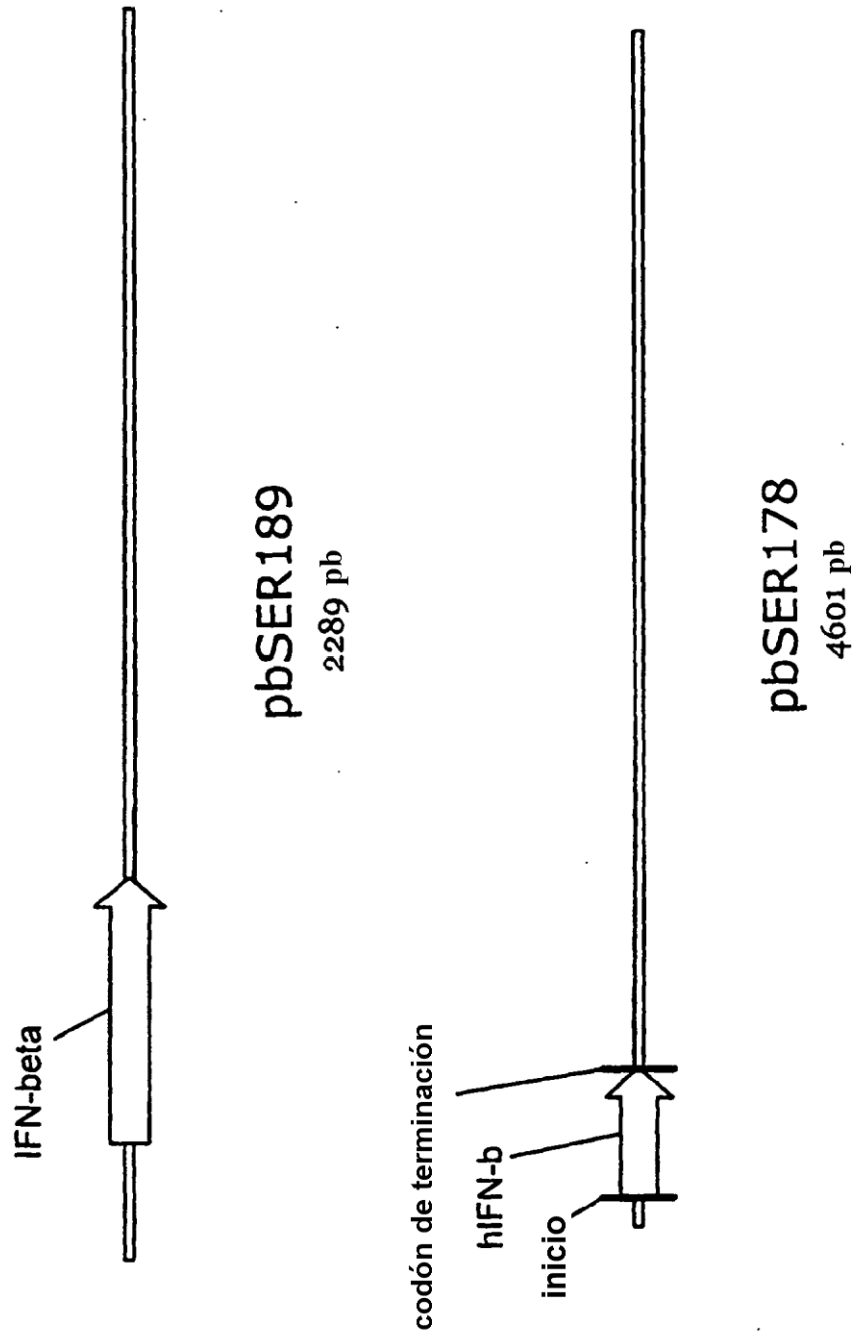
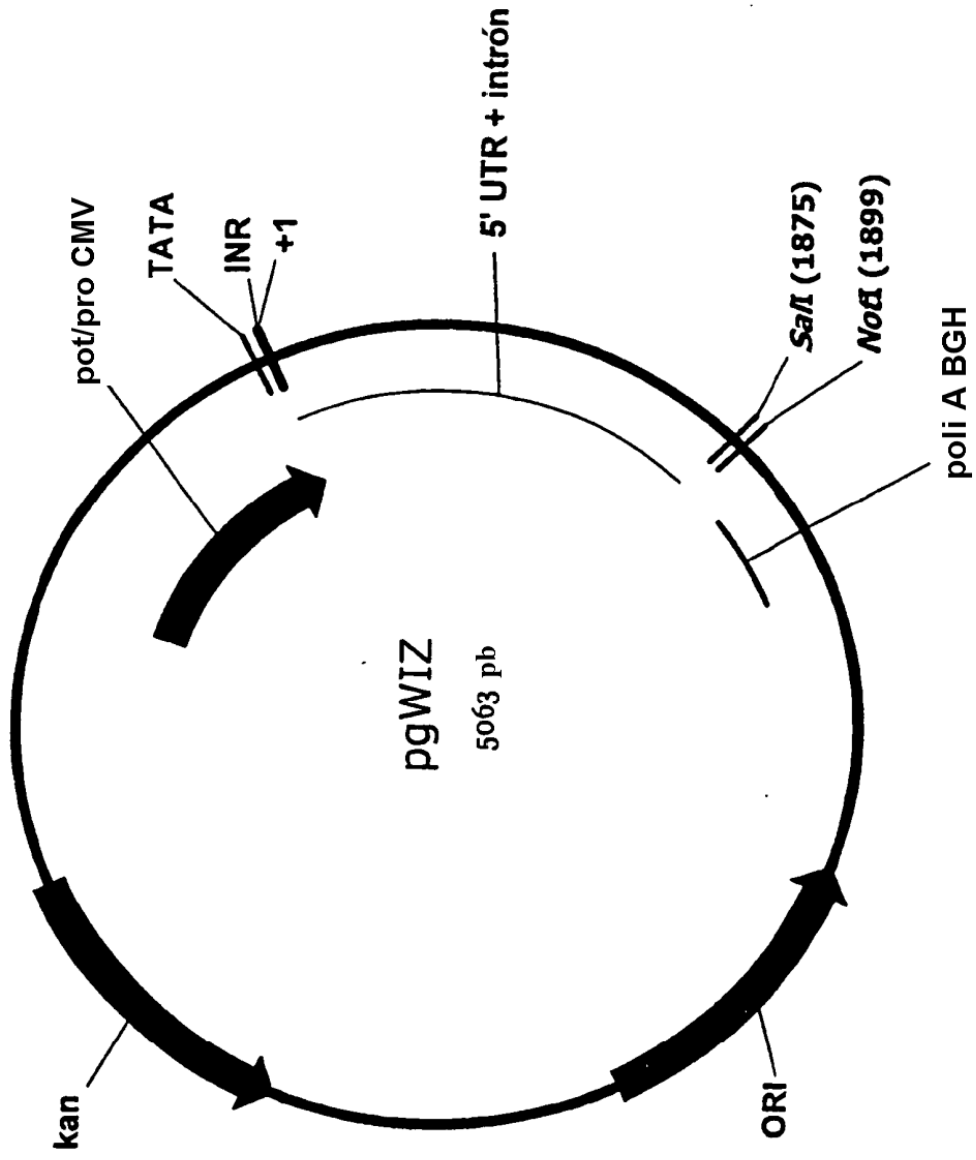
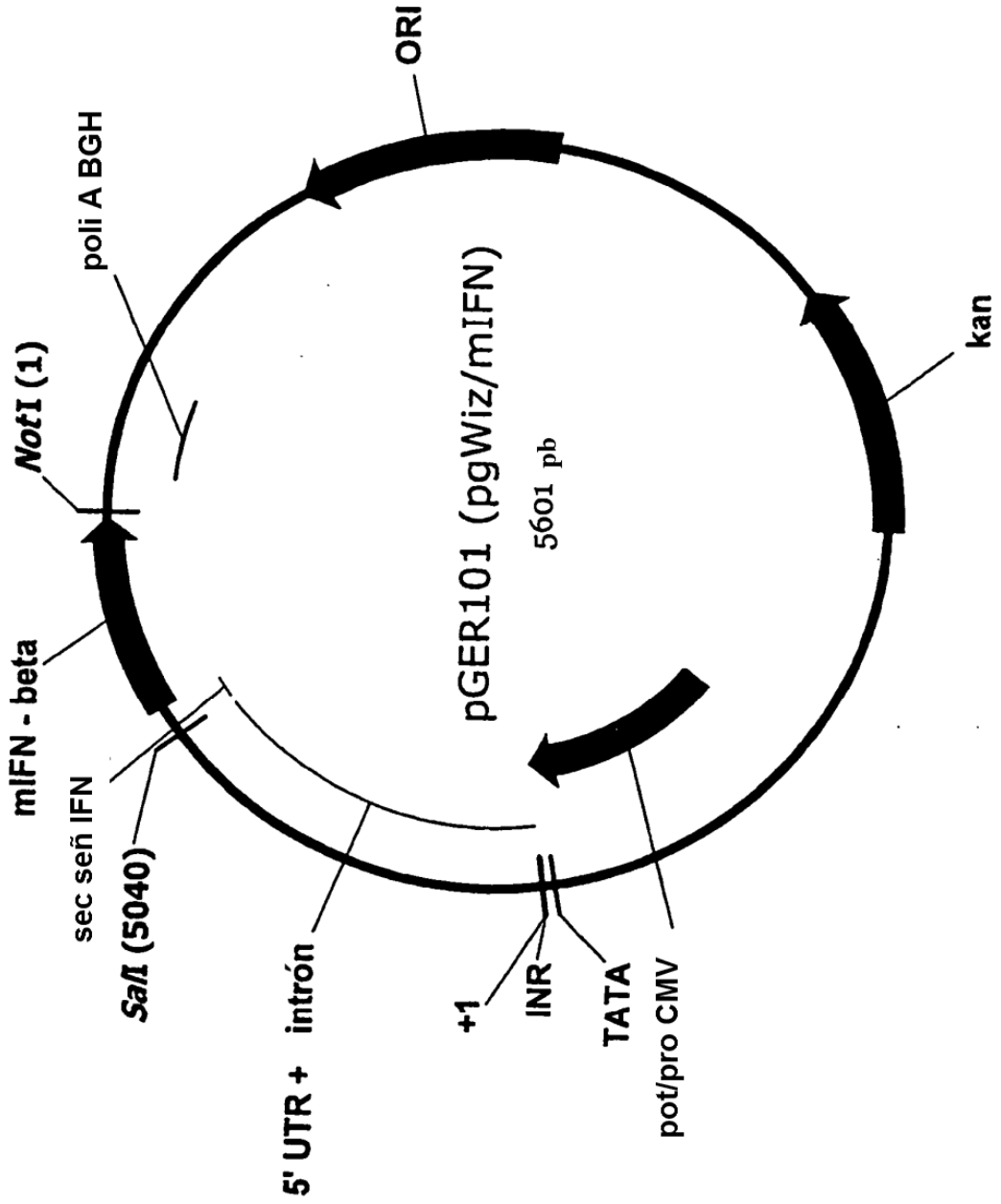
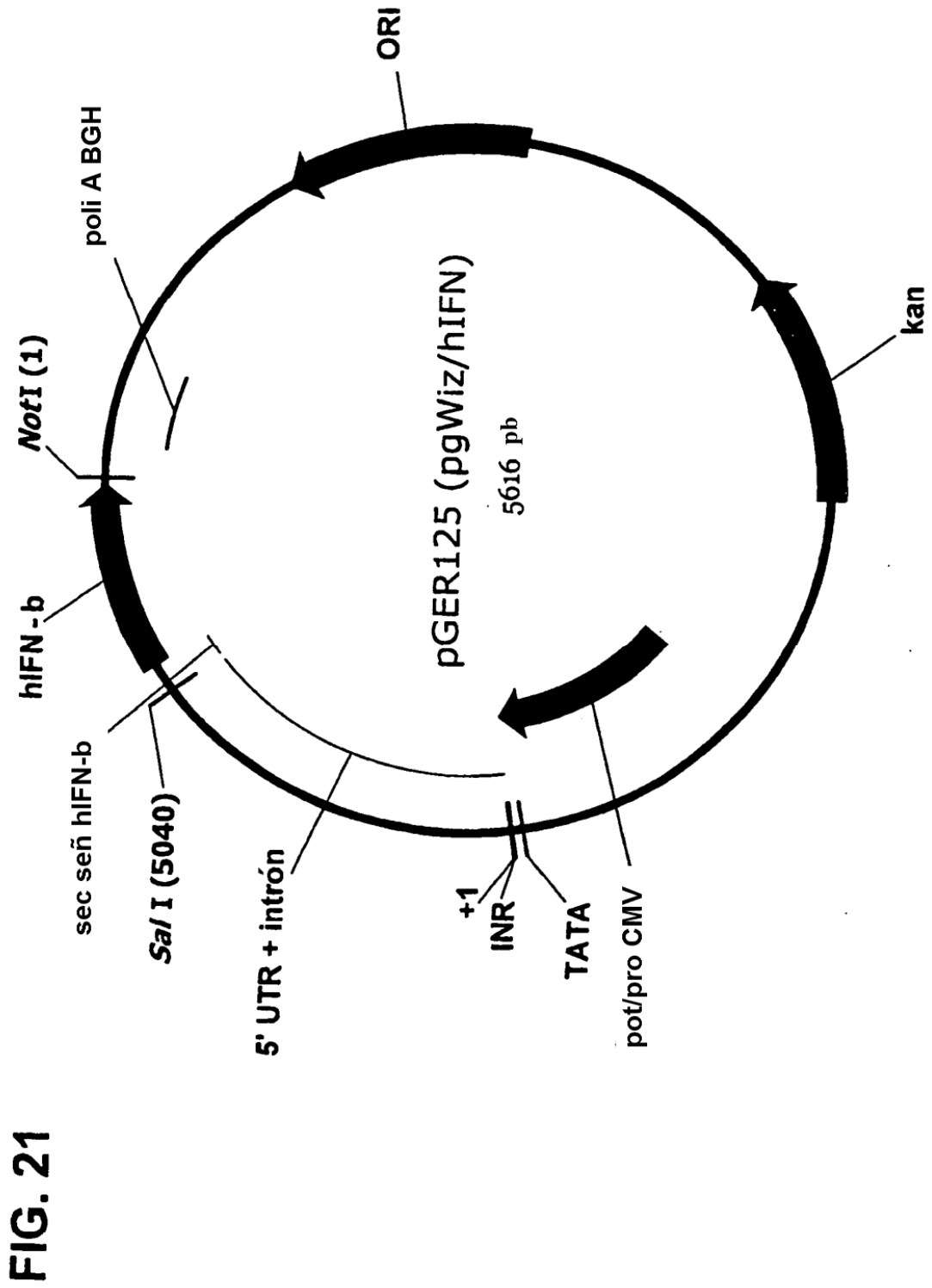


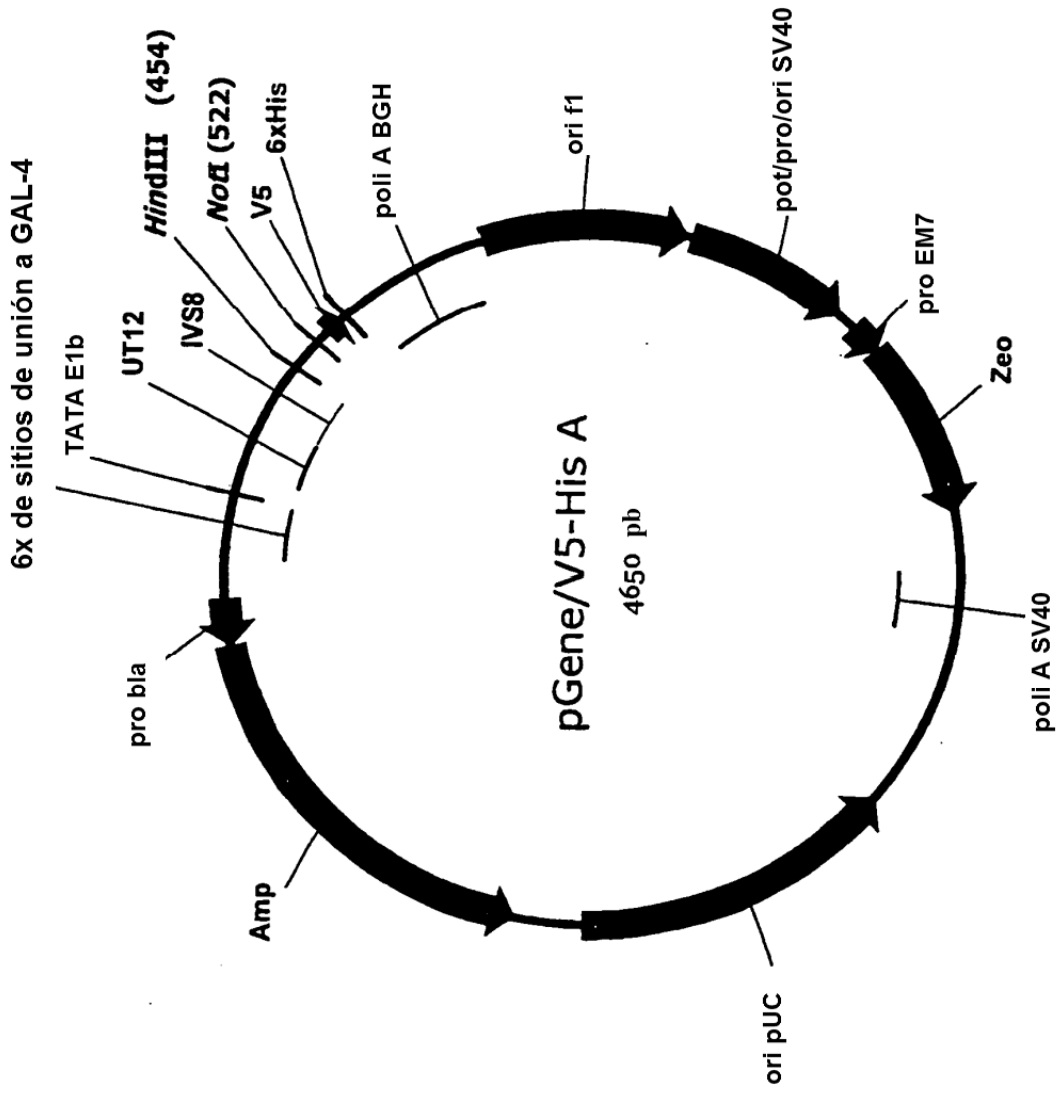
FIG. 20B



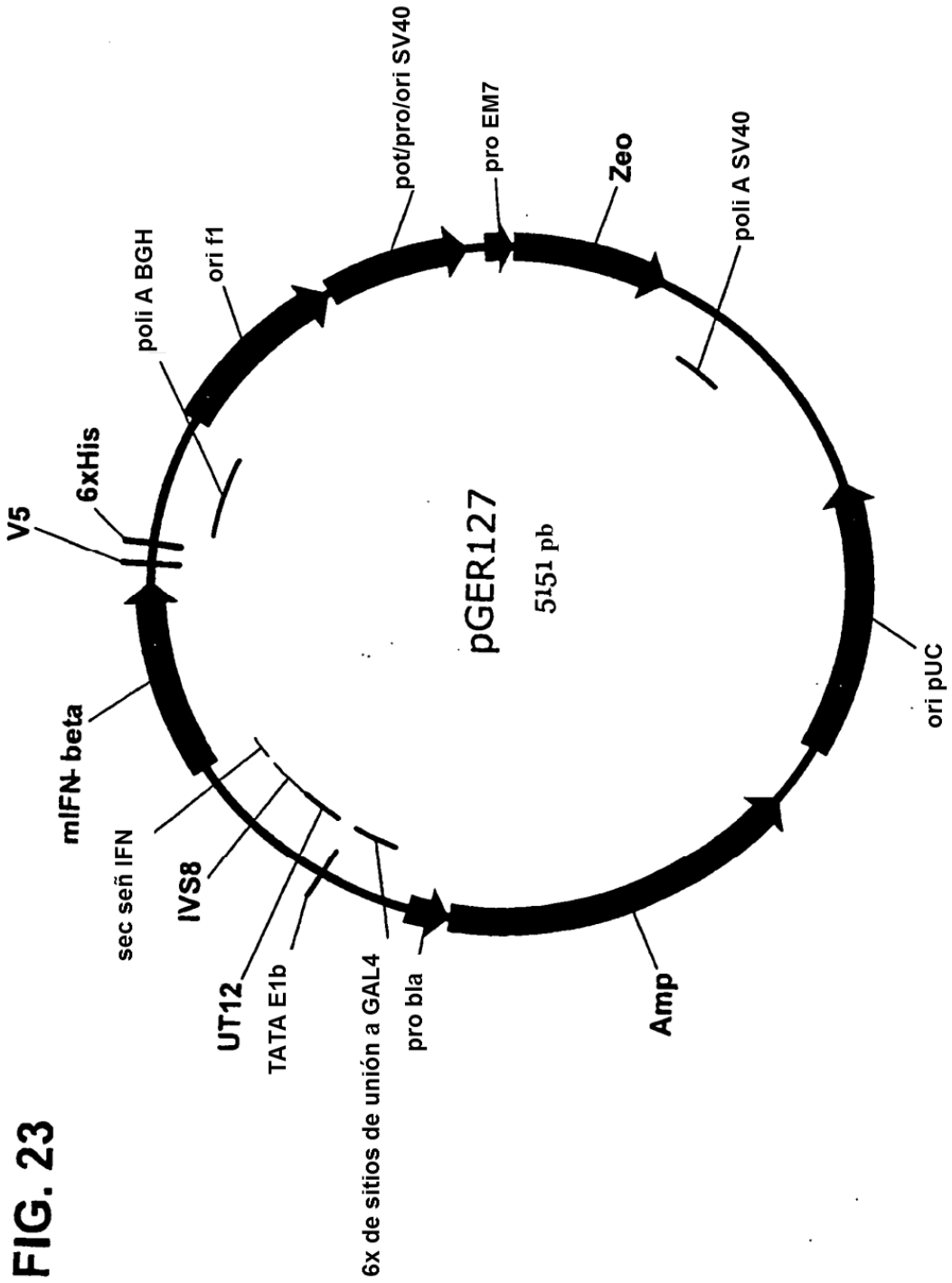
**FIG. 20C**

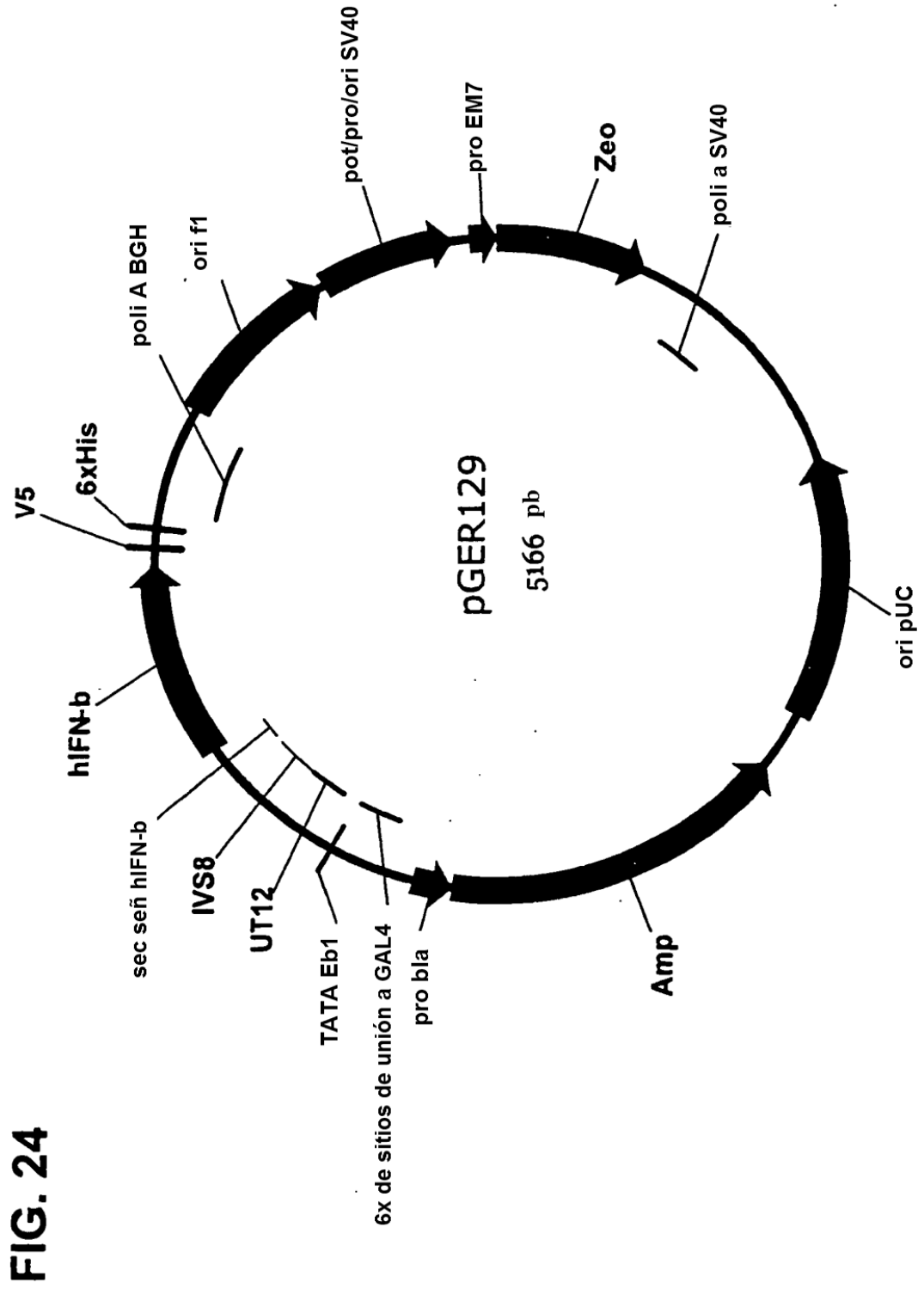






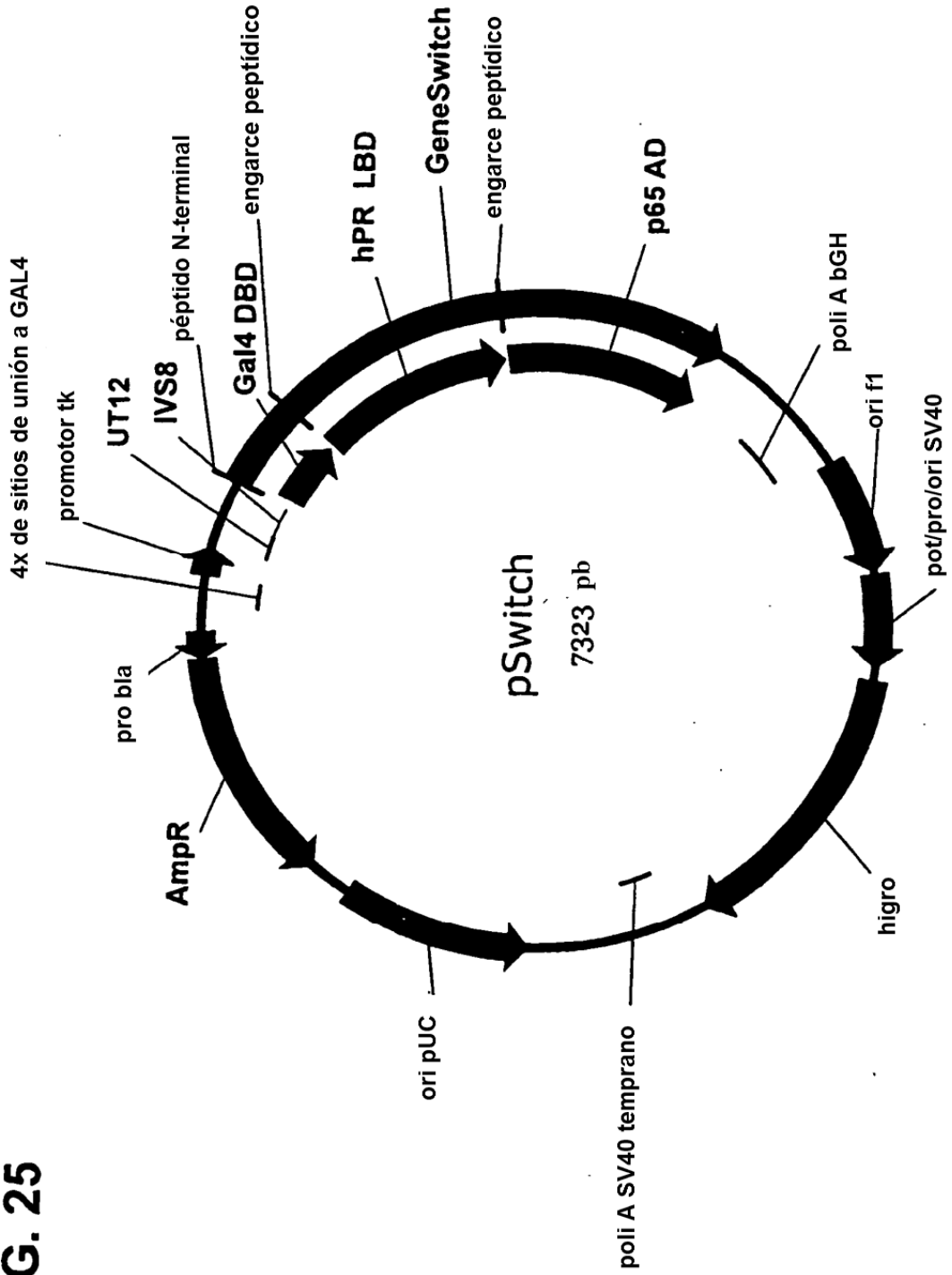
**FIG. 22**

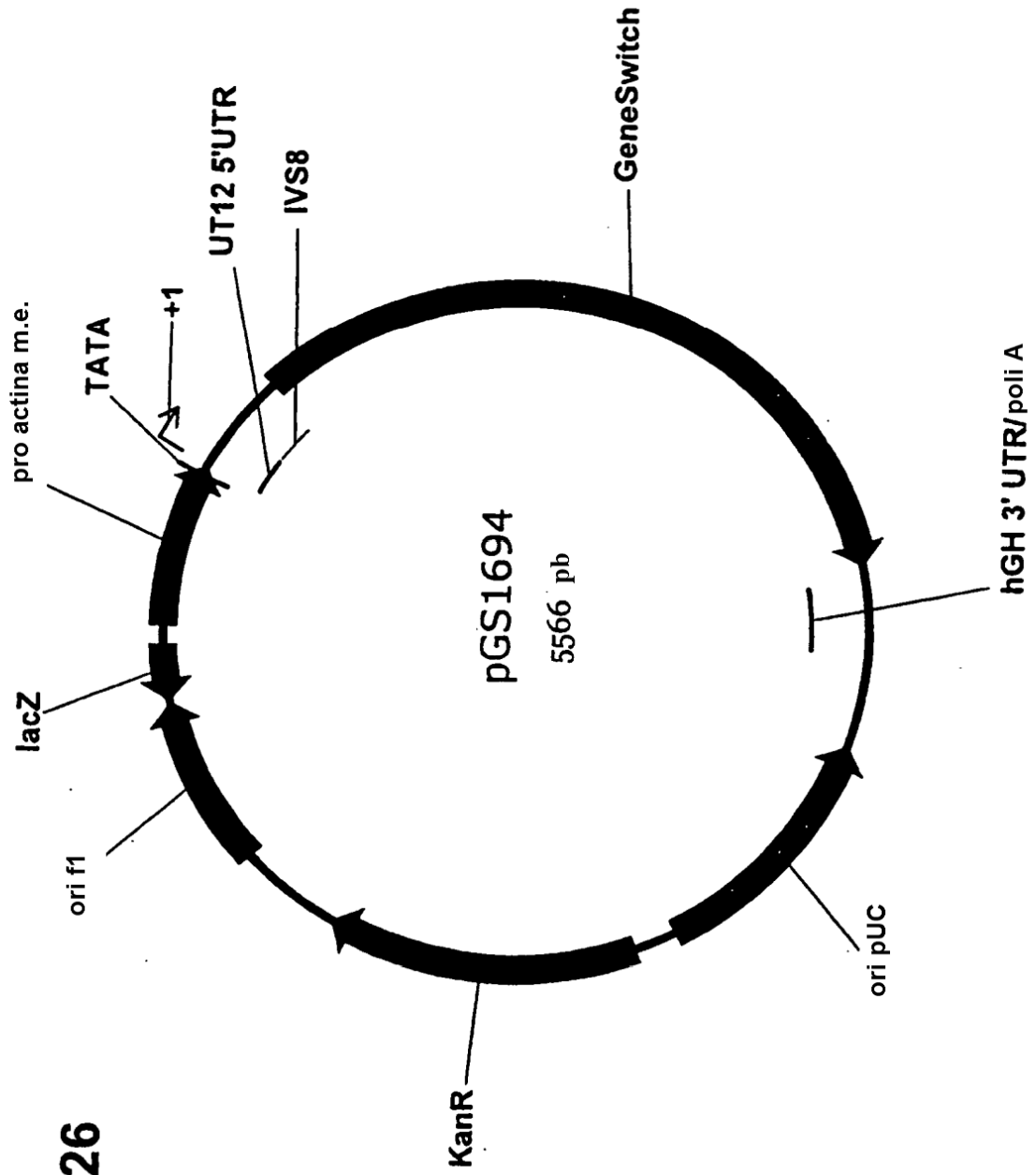




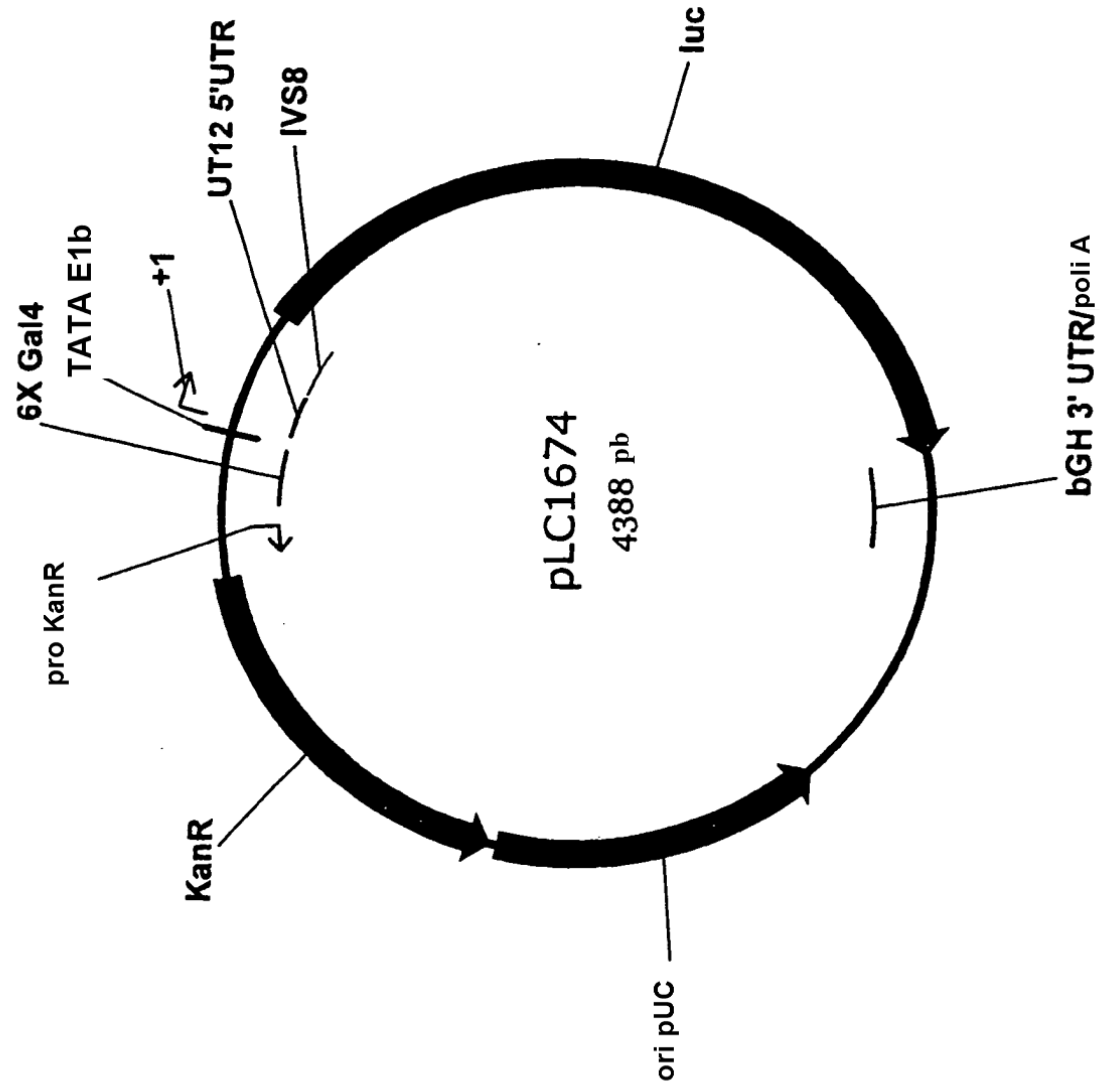


**FIG. 25**



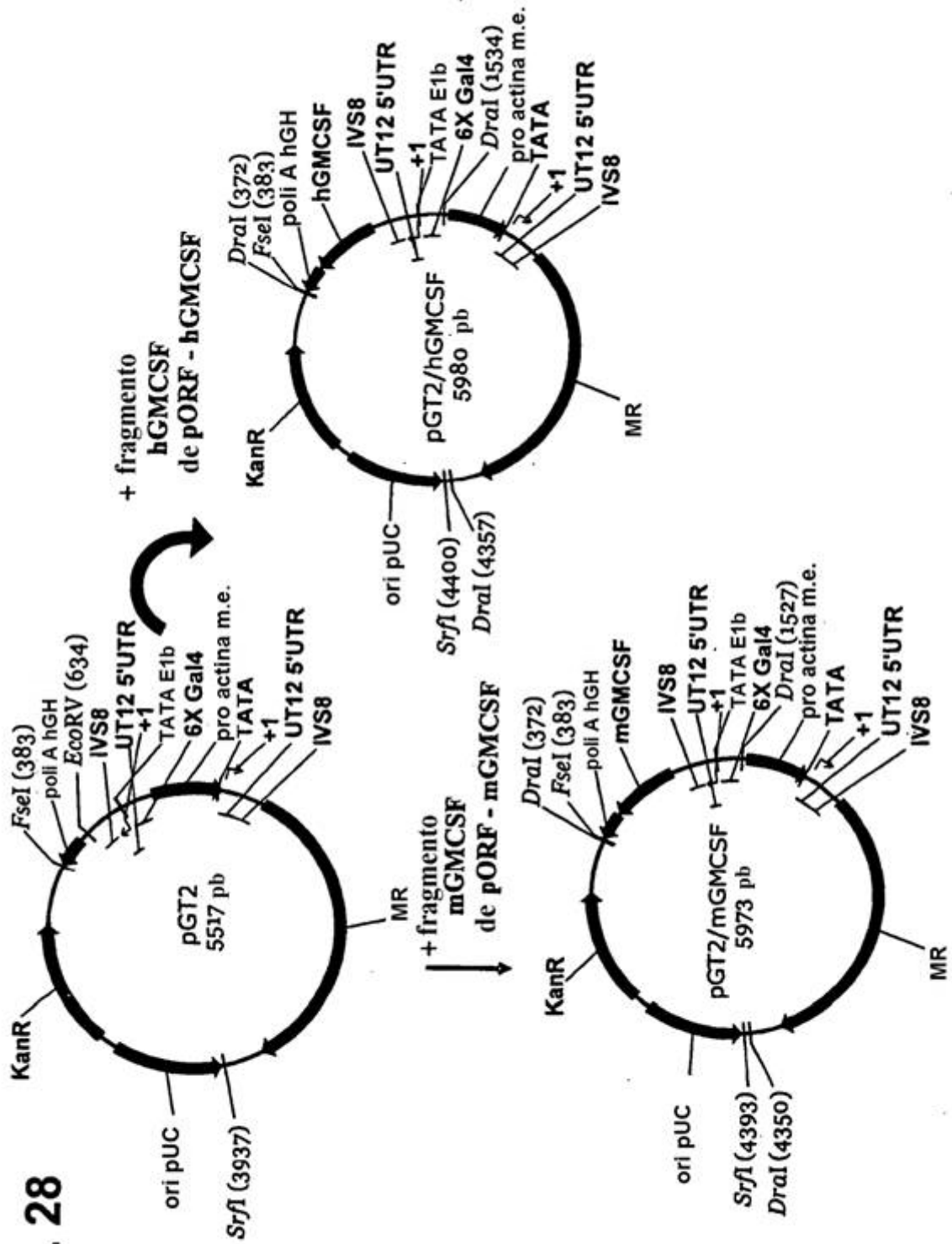


**FIG. 26**

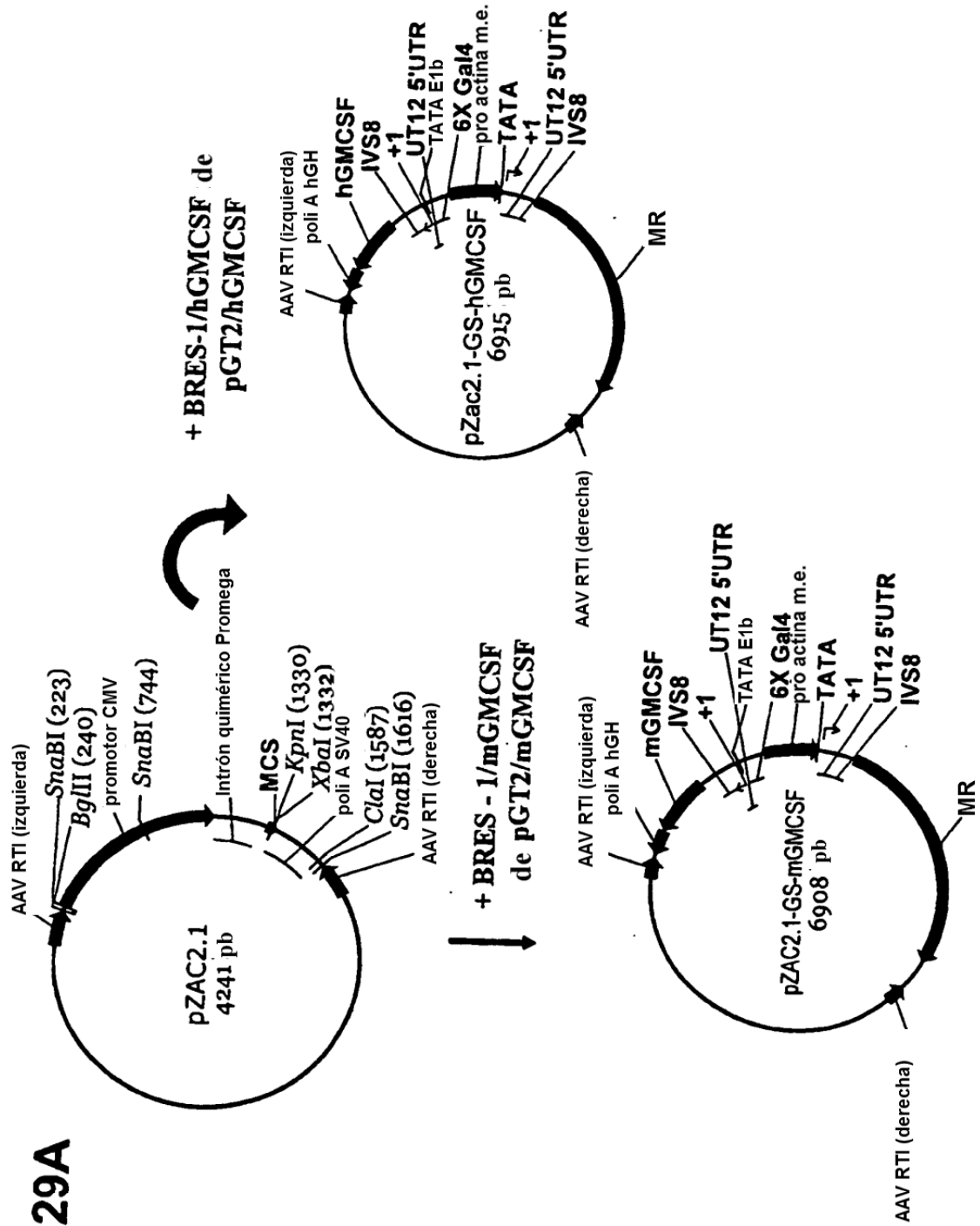


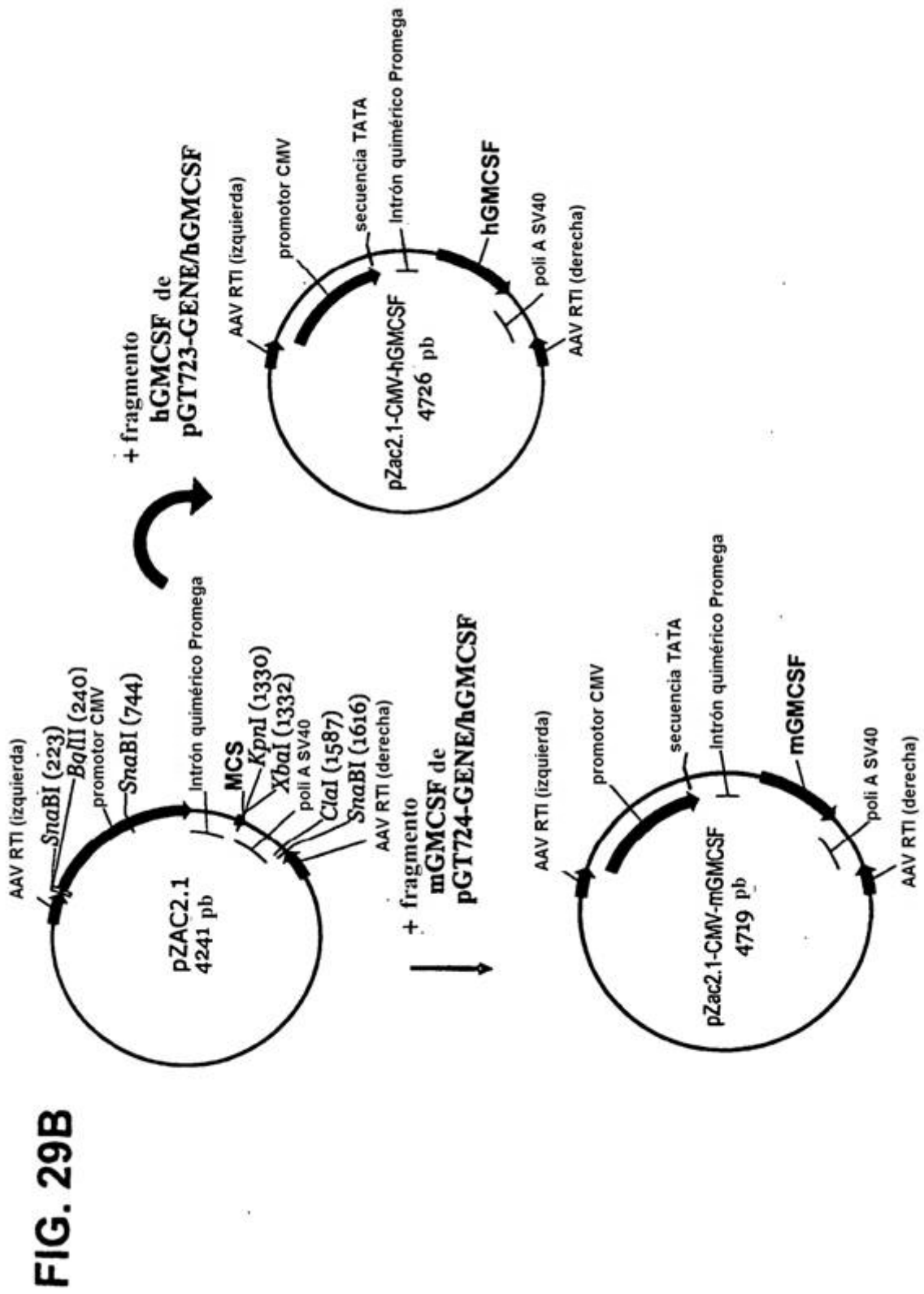
**FIG. 27**

**FIG. 28**

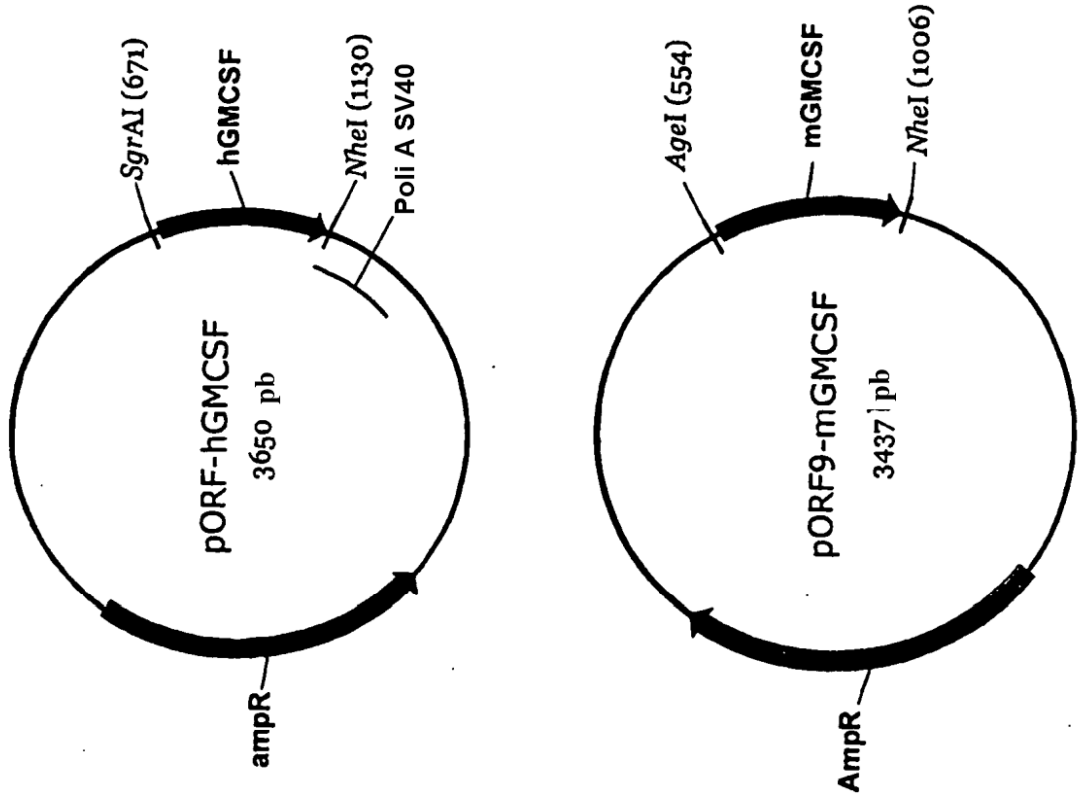


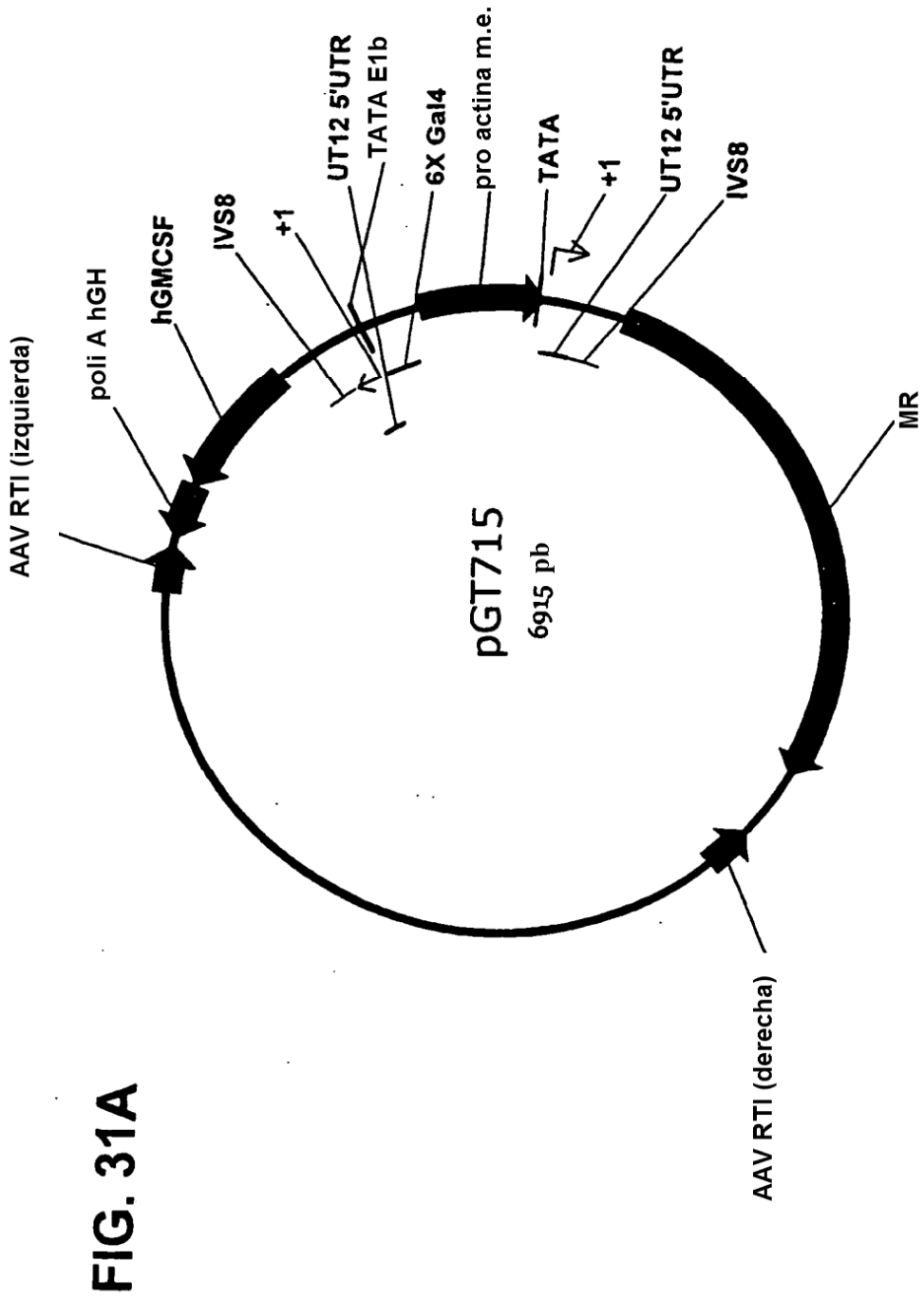
**FIG. 29A**



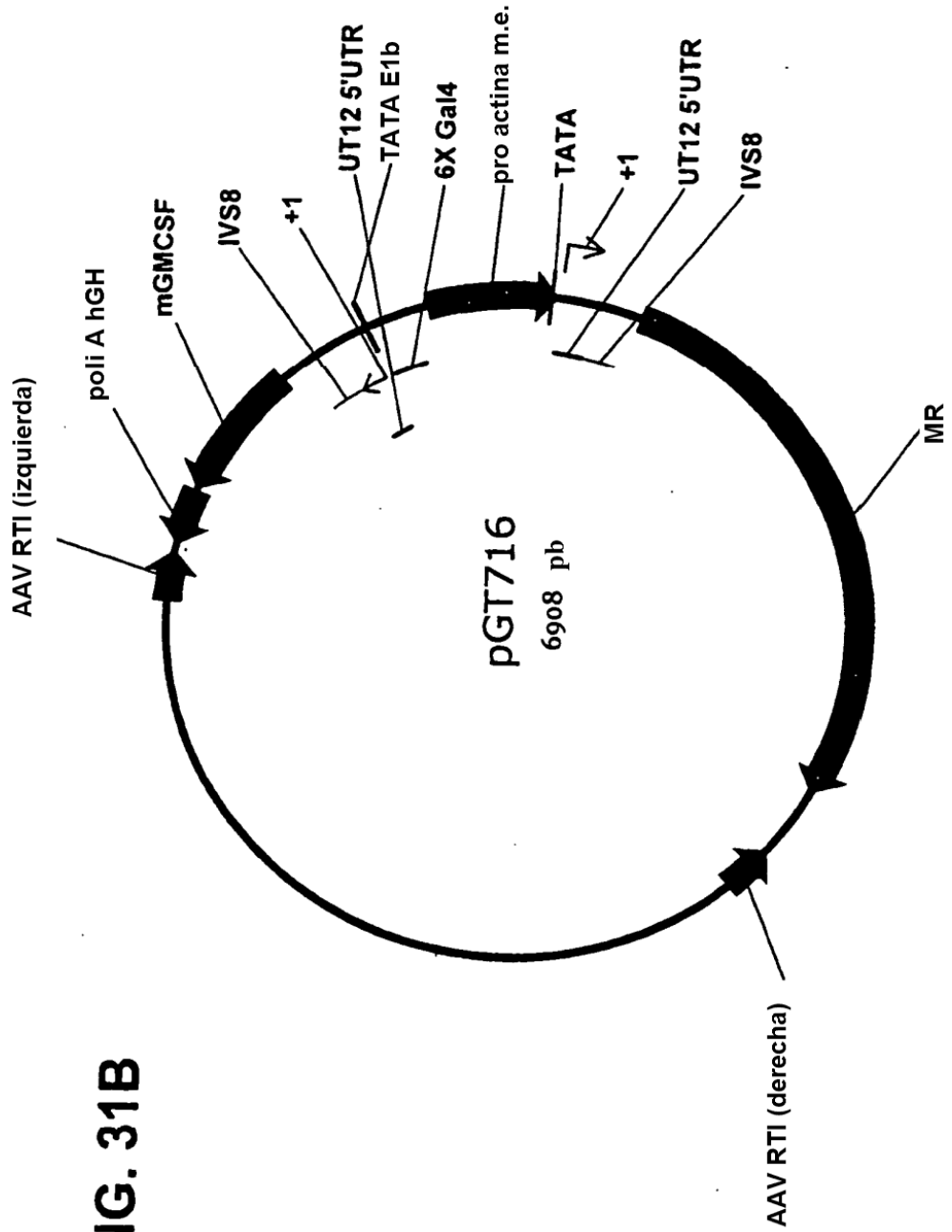


**FIG. 30**









**FIG. 31B**

**FIG. 32**

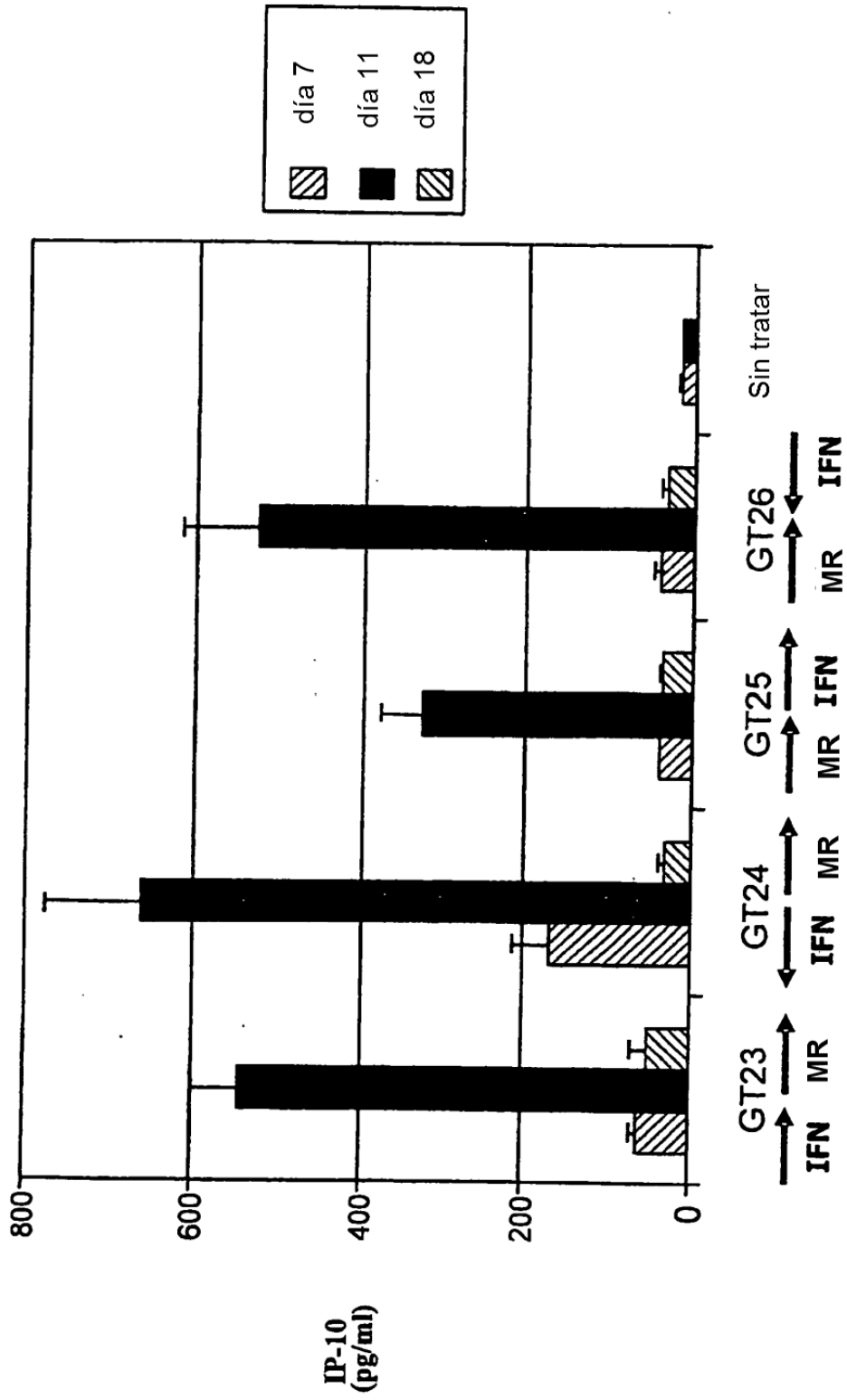


FIG. 33

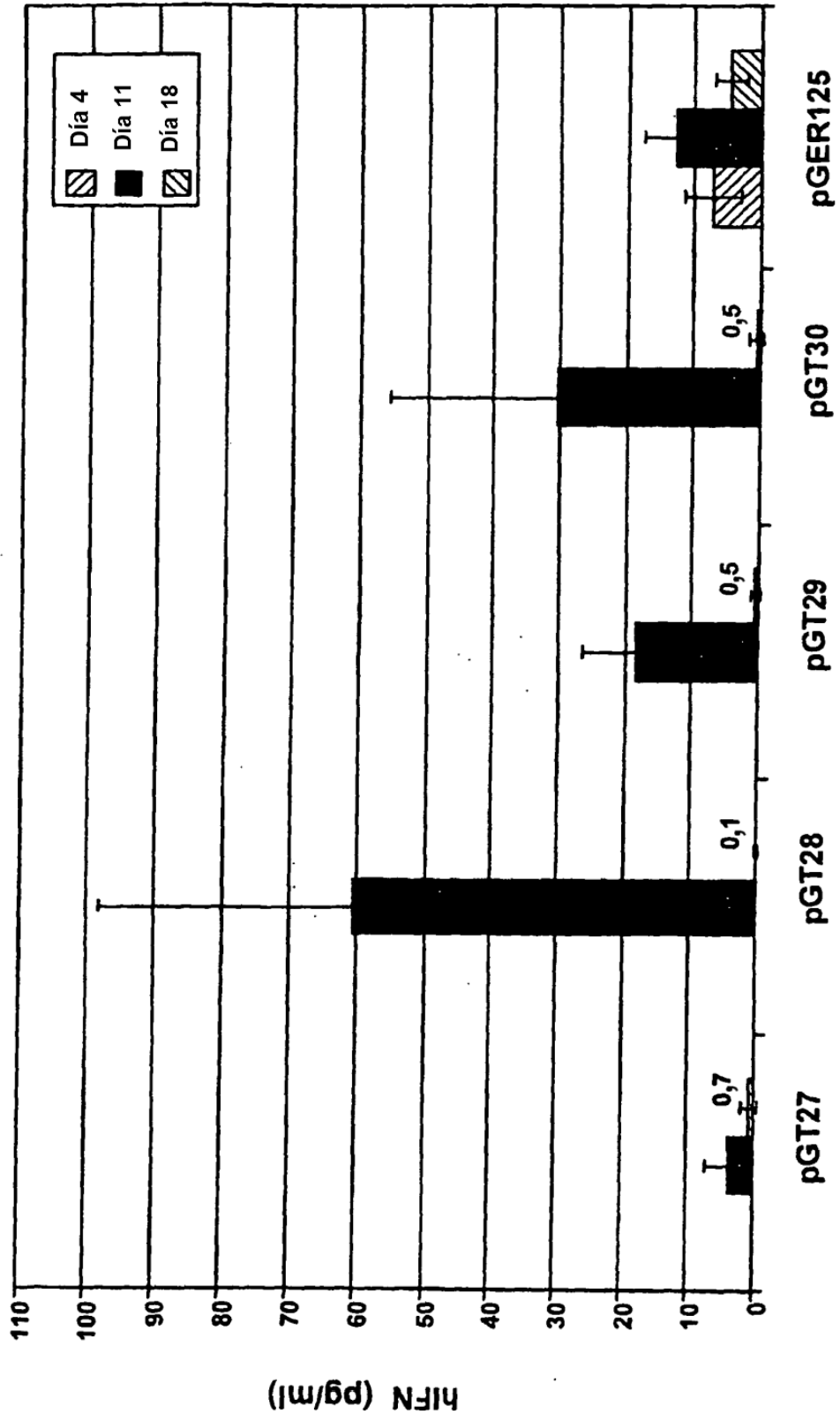


FIG. 34A

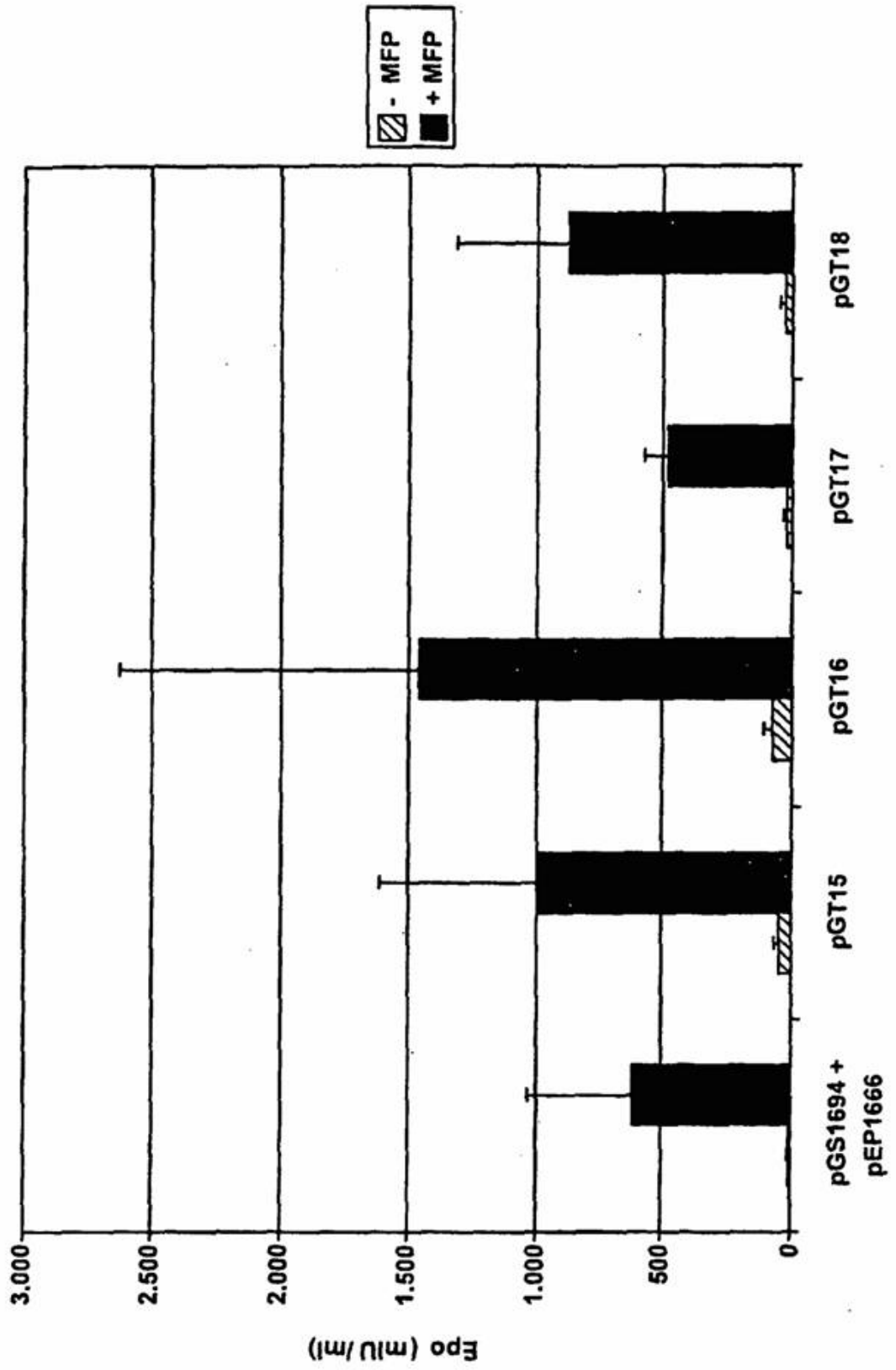


FIG. 34B

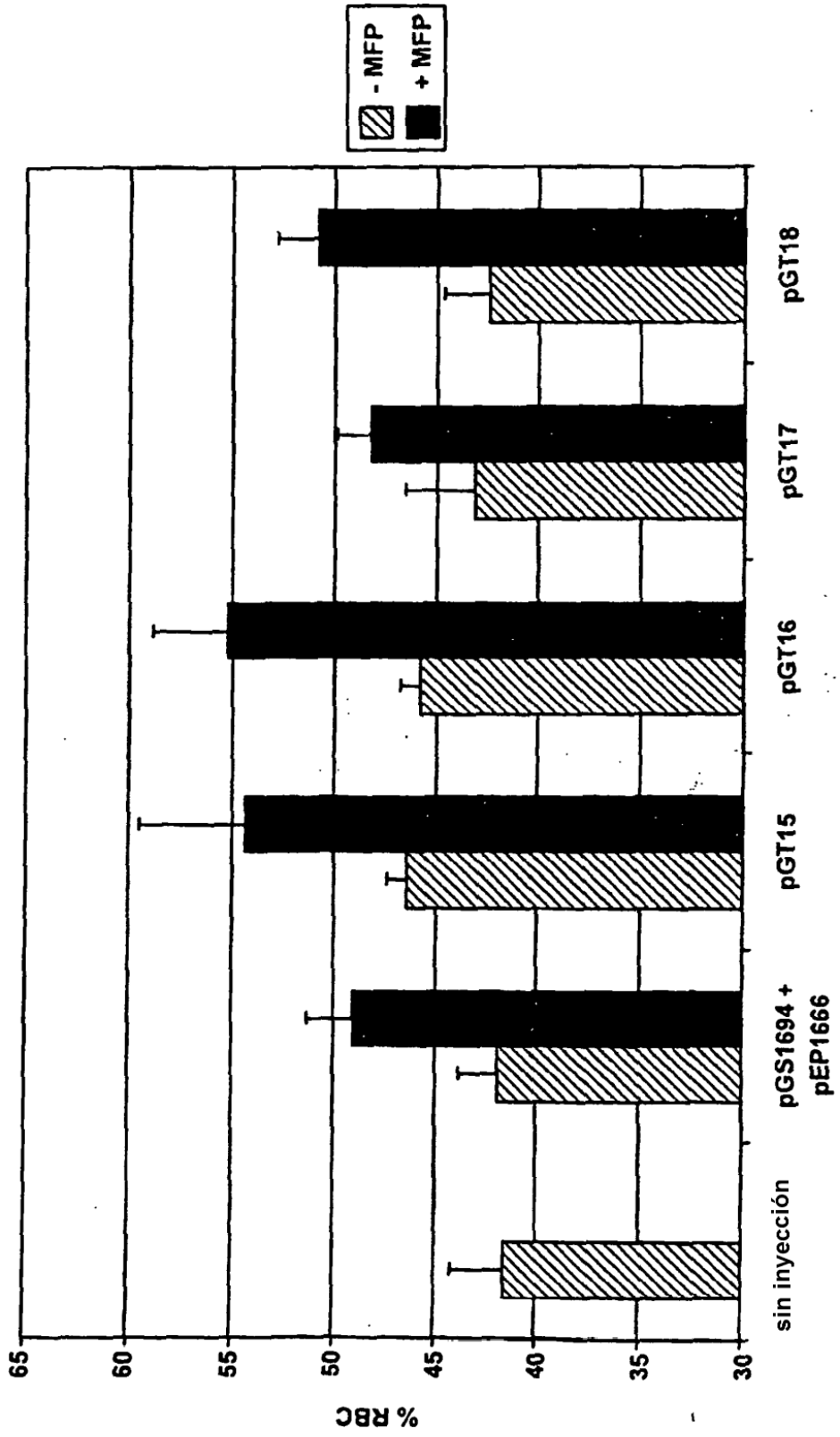


FIG. 35

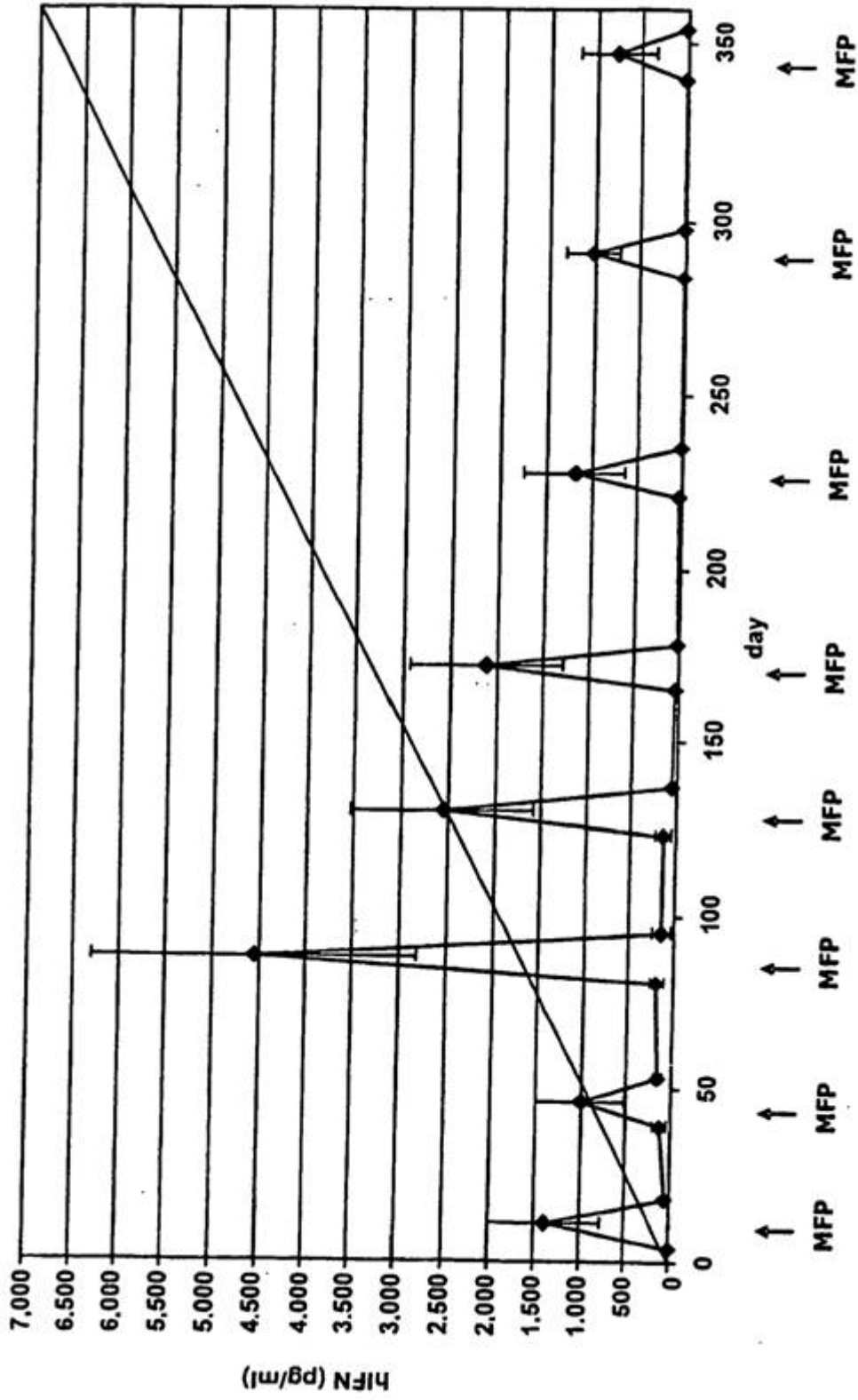
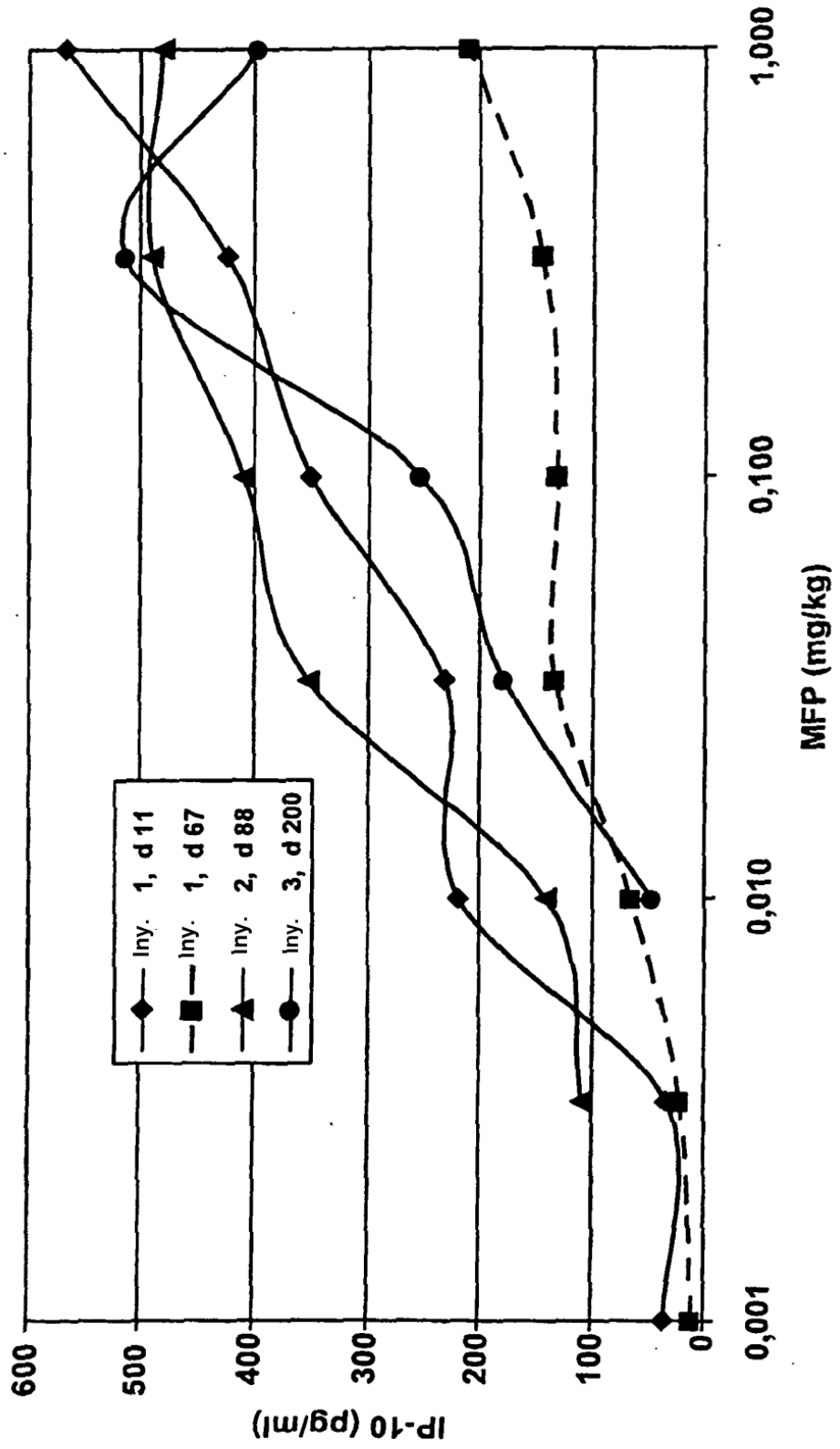
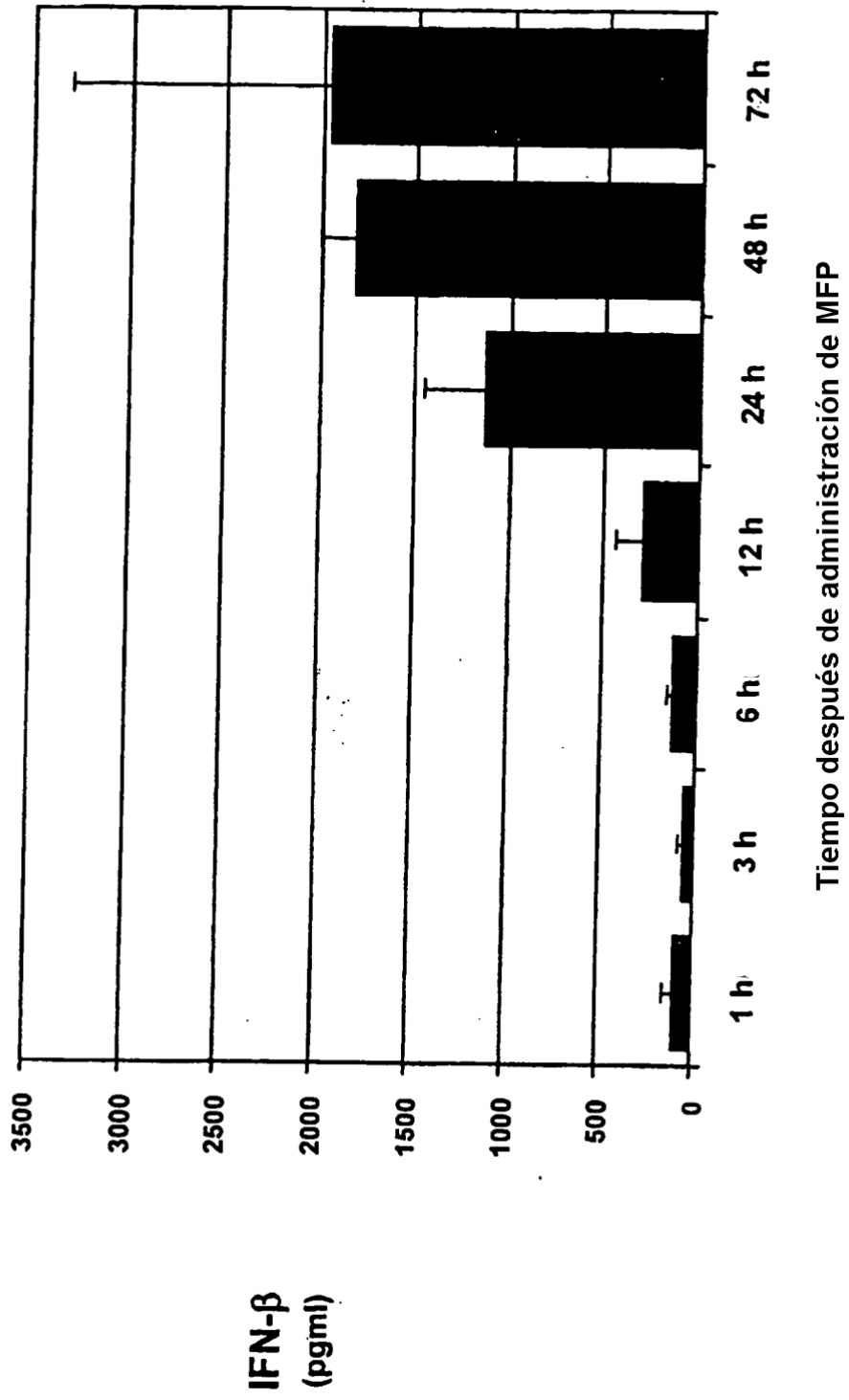


FIG. 36

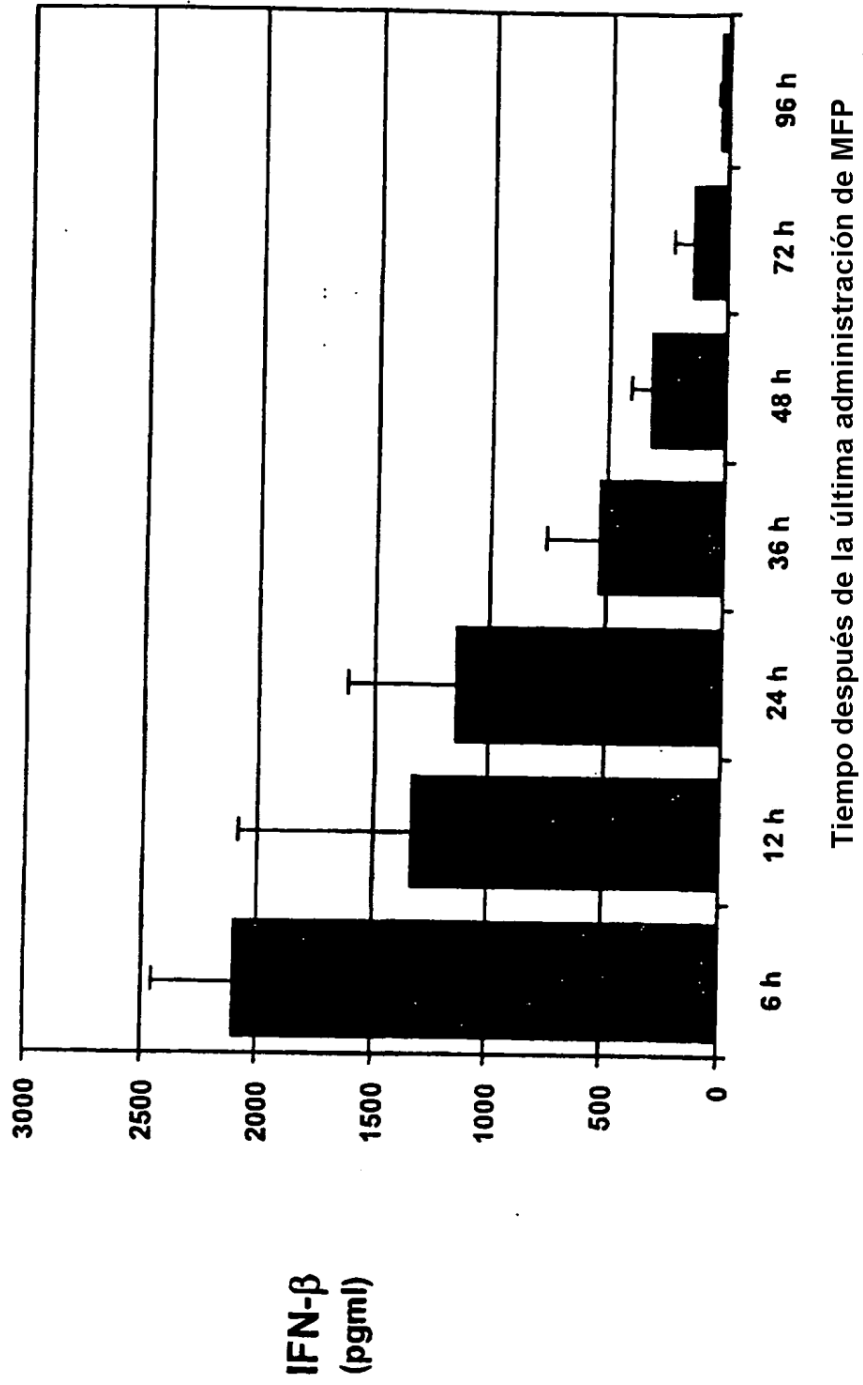


**FIG. 37A**





**FIG. 37B**



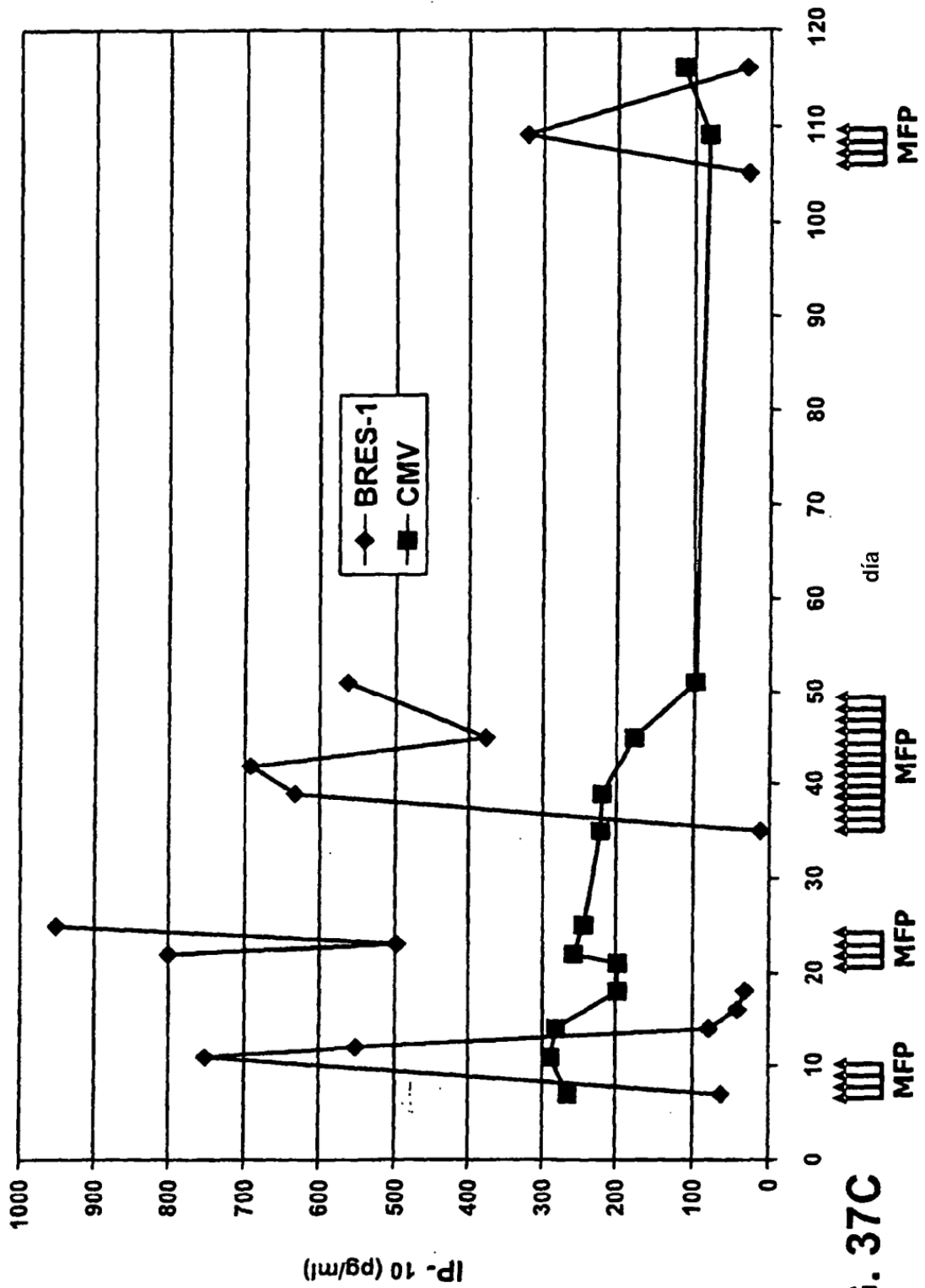
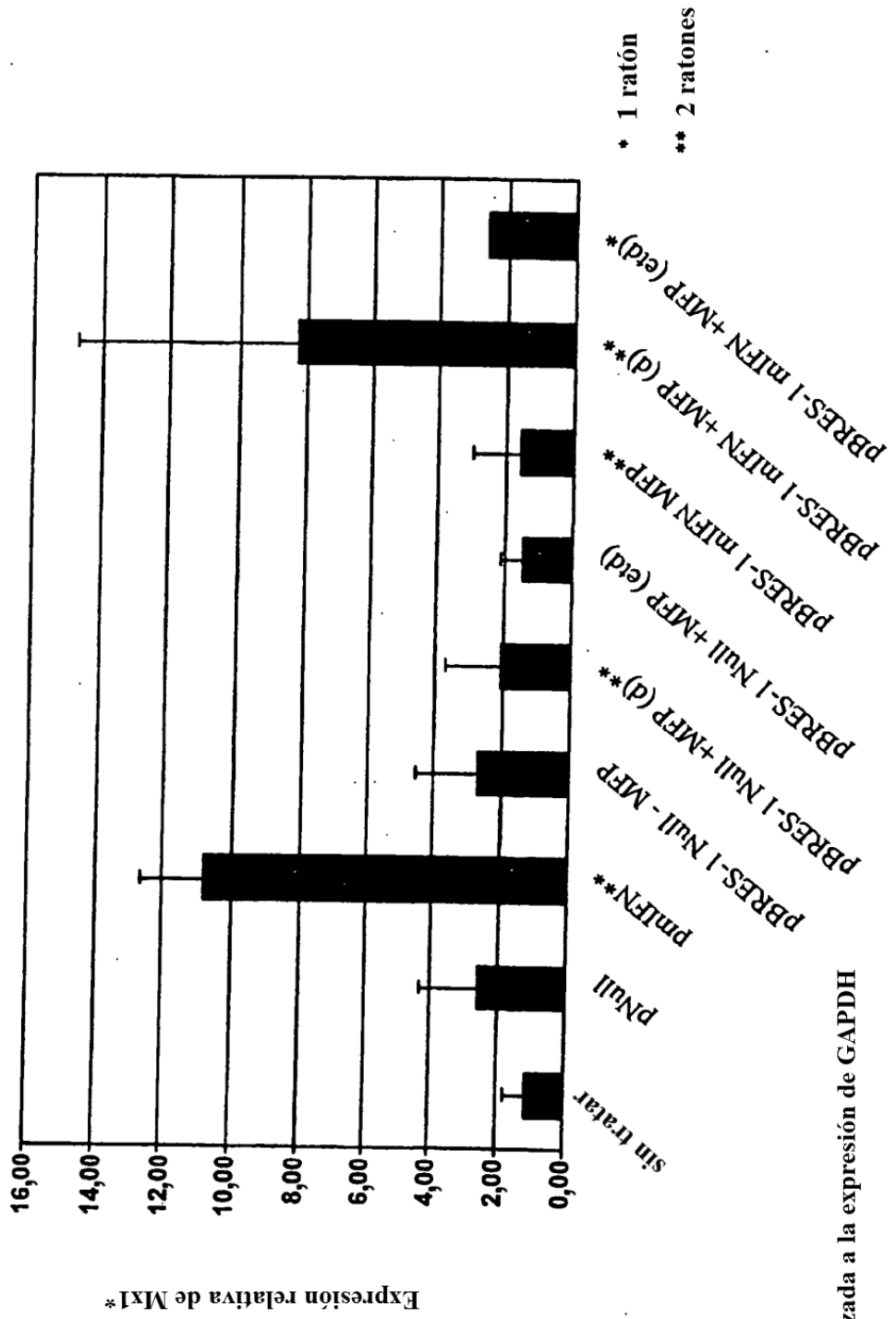
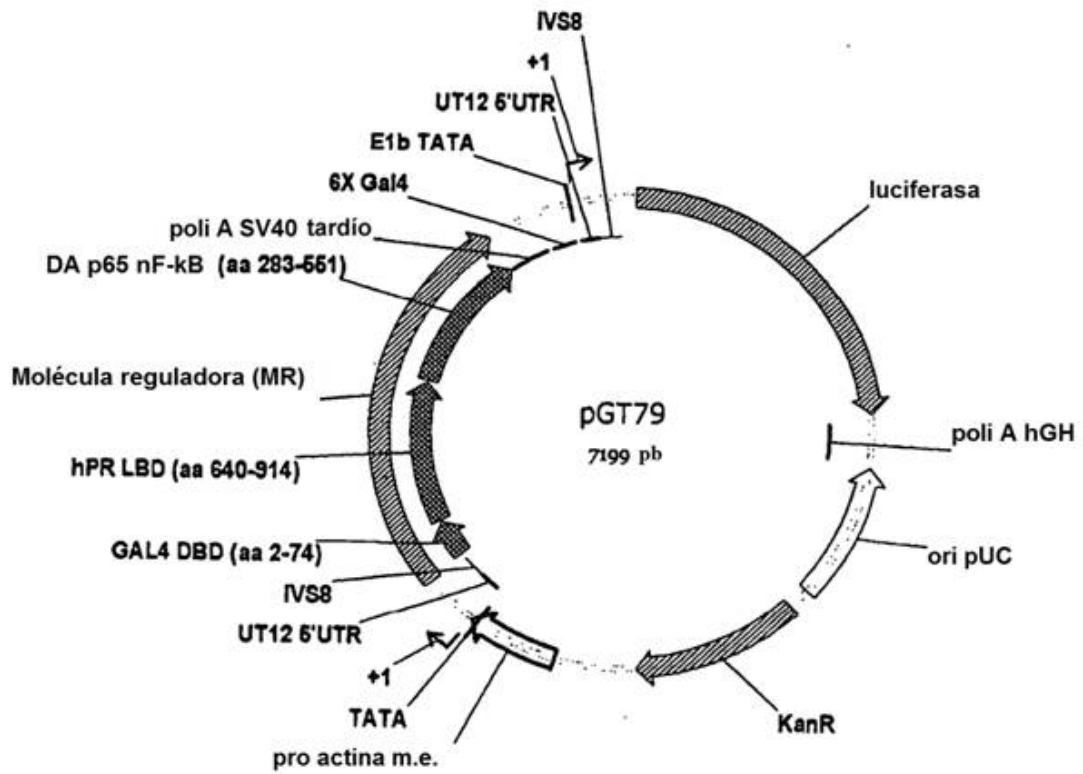


FIG. 37C

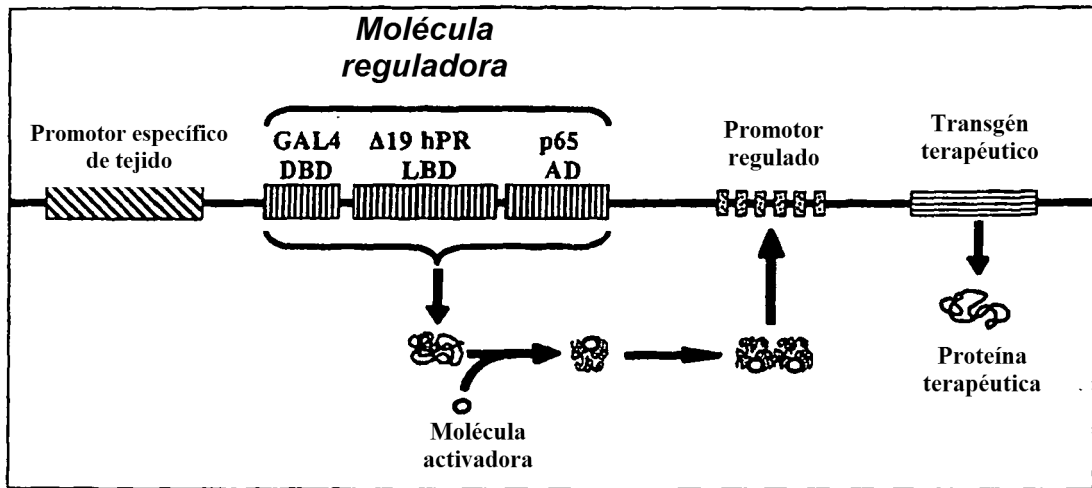
**FIG. 38**



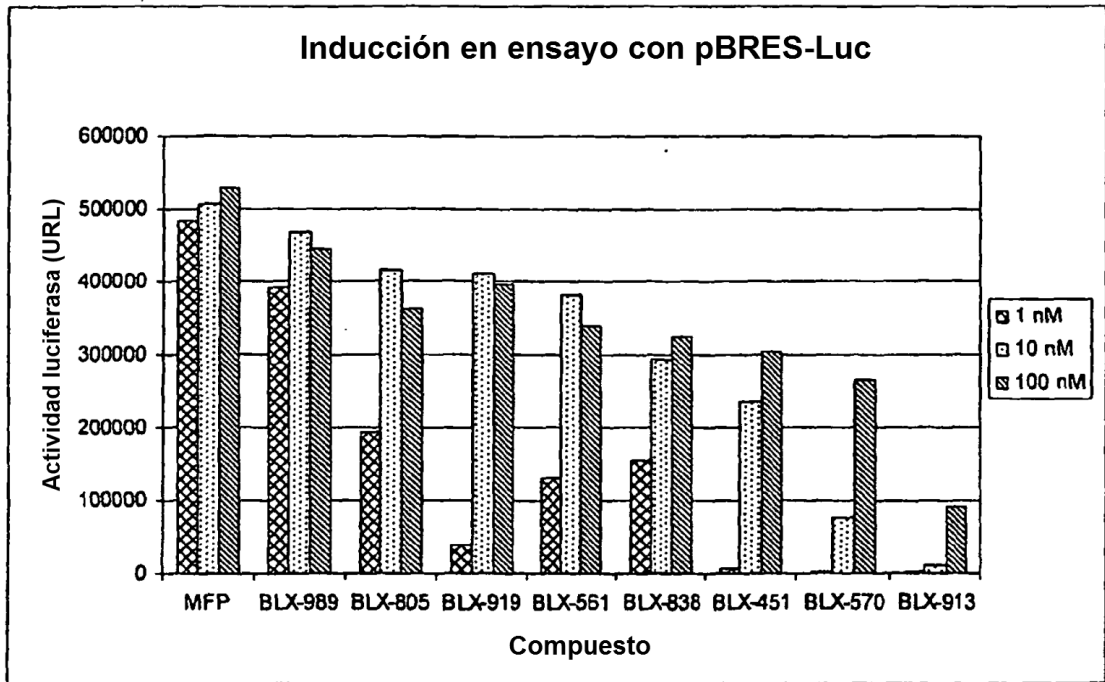
\* normalizada a la expresión de GAPDH



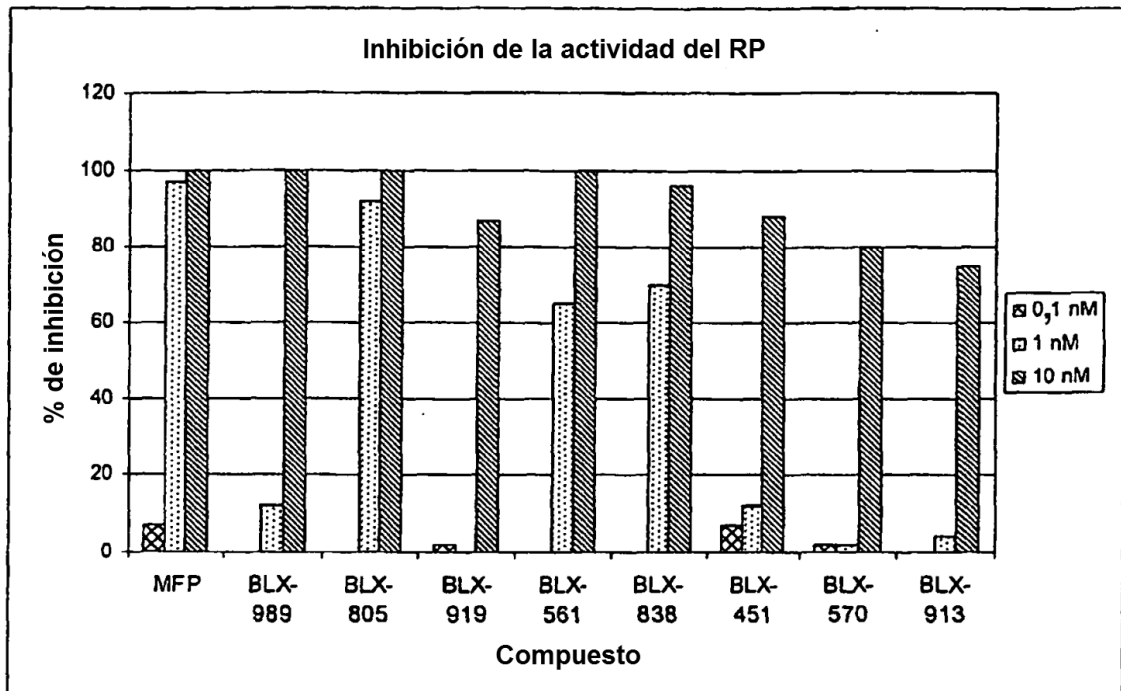
**Figura 39.** Sistema pBRES de un solo plásmido. El sistema pBRES combina la Molécula Reguladora (MR) y la Molécula Terapéutica (MT) o gen indicador en un solo plásmido. Son posibles cuatro orientaciones diferentes de MR y MT/gen indicador. Como ejemplo se muestra la orientación de pGT79.



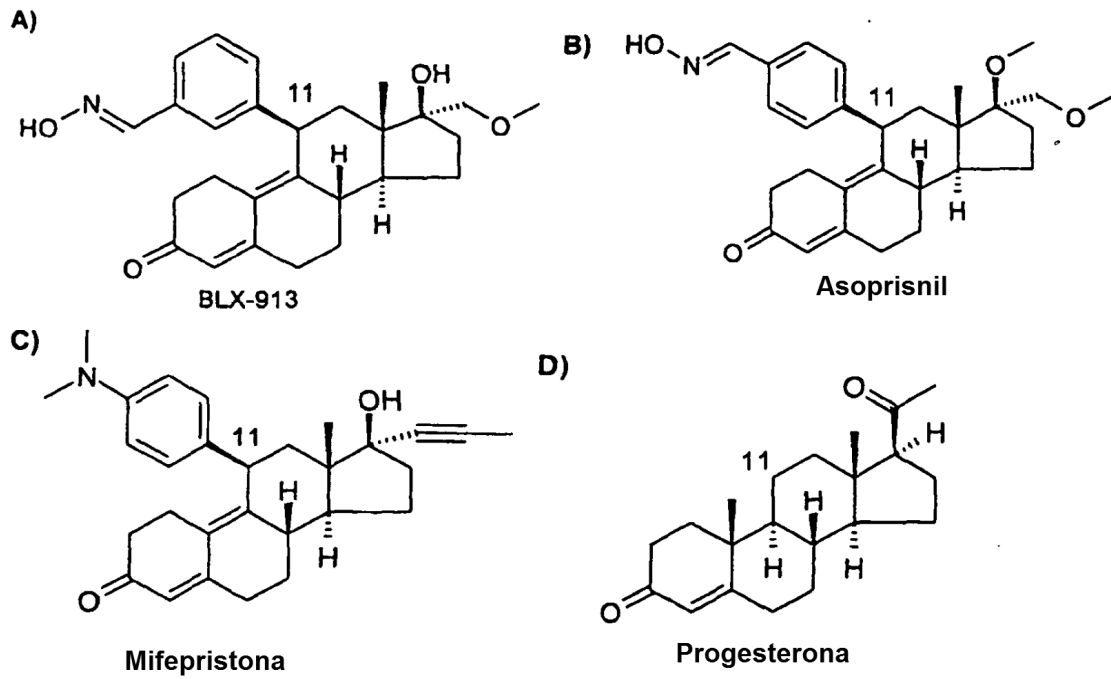
**Figura 40.** Visión de conjunto de la activación del sistema pBRES. La MA se une a la MR induciendo su dimerización y translocación en el núcleo. El complejo MA/MR se une al promotor regulado activando la transcripción de la MT o gen indicador.



**Figura 41.** Inducción de la expresión de luciferasa por ocho compuestos de clase 3 identificados en la exploración directa. Se transfectaron temporalmente células 3T3 NIH de fibroblasto murino con el plásmido pBRES-Luc. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con MFP o con un compuesto de ensayo a concentraciones de 1, 10 y 100 nM. Después de 24 horas de tratamiento, el grado de activación de MR se determinó midiendo la cantidad de indicador luciferasa expresado.

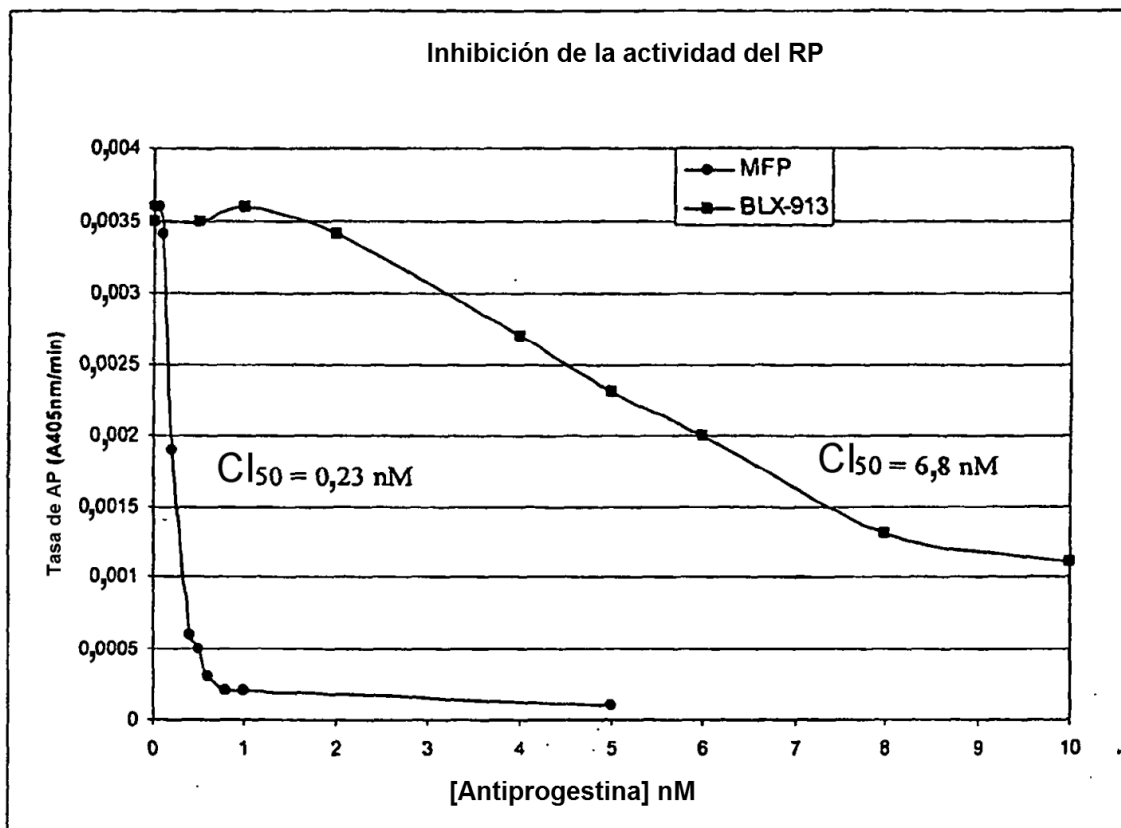


**Figura 42.** Inhibición de la actividad del receptor de progesterona por los ocho compuestos de clase 3 identificados a partir de la exploración dirigida. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se permitió su unión durante una noche. El medio de crecimiento que contenía FBS al 10 % se cambió por medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al siguiente día, las células se trataron con MFP o con los compuestos de ensayo a concentraciones de 0,1, 1 y 10 nM durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, un agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad de la AP en lisados de células tratadas se midió mediante su capacidad para hidrolizar el para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG para la unión con el RP e inhiben la expresión de la AP en células T47D. El grado de esta inhibición se presenta como la inhibición porcentual con compuestos más potentes (tales como MFP) capaces de inhibir al 100 % la expresión de la AP dependiente del RP.

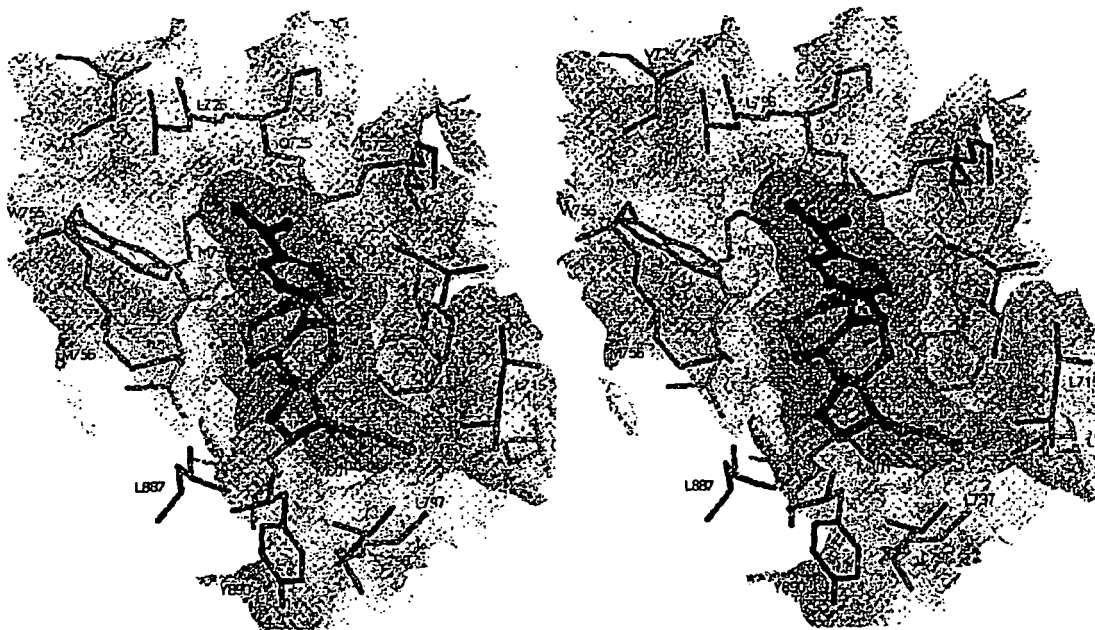


**Figura 43.** Estructuras de A) el compuesto BLX-913 seleccionado para estrategia de mutagénesis guiada estructural; B) candidato clínico avanzado Asoprisnil; C) antiprogesterina aprobada clínicamente Mifepristona; D) Progesterona. La similitud entre las estructuras BLX-913 y Asoprisnil sugieren la fuerte correlación entre los datos de seguridad disponibles para Asoprisnil y los de BLX913.

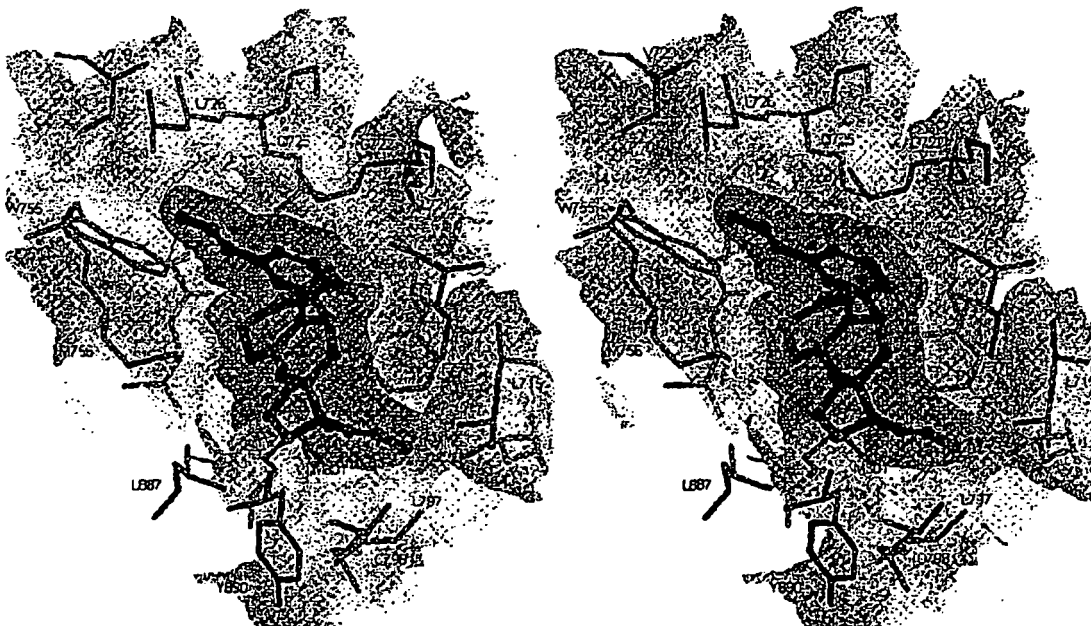




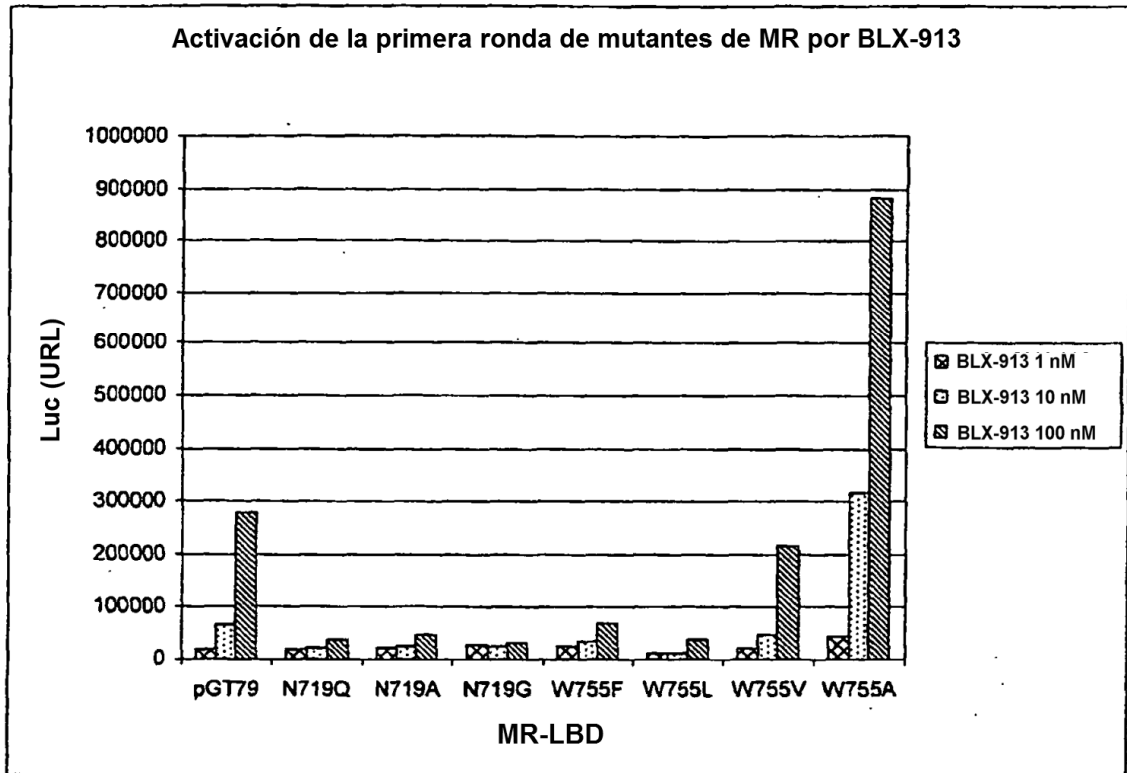
**Figura 44** Inhibición de la actividad de la Fosfatasa Alcalina (AP) inducida por RP por la potente antiprogestina Mifepristona (MFP) y el nuevo compuesto candidato de Molécula Activadora BLX-913. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se permitió su unión durante una noche. El medio de cultivo que contenía FBS al 10 % se cambió por medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al día siguiente, las células se trataron con MFP o BLX-913 durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, un agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad de la AP en lisados de células tratadas se mide mediante su capacidad para hidrolizar el para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG por la unión a RP e inhiben la expresión de la AP en células T47D, dando como resultado una tasa disminuida de la actividad de la AP a mayores concentraciones de antiprogestina.



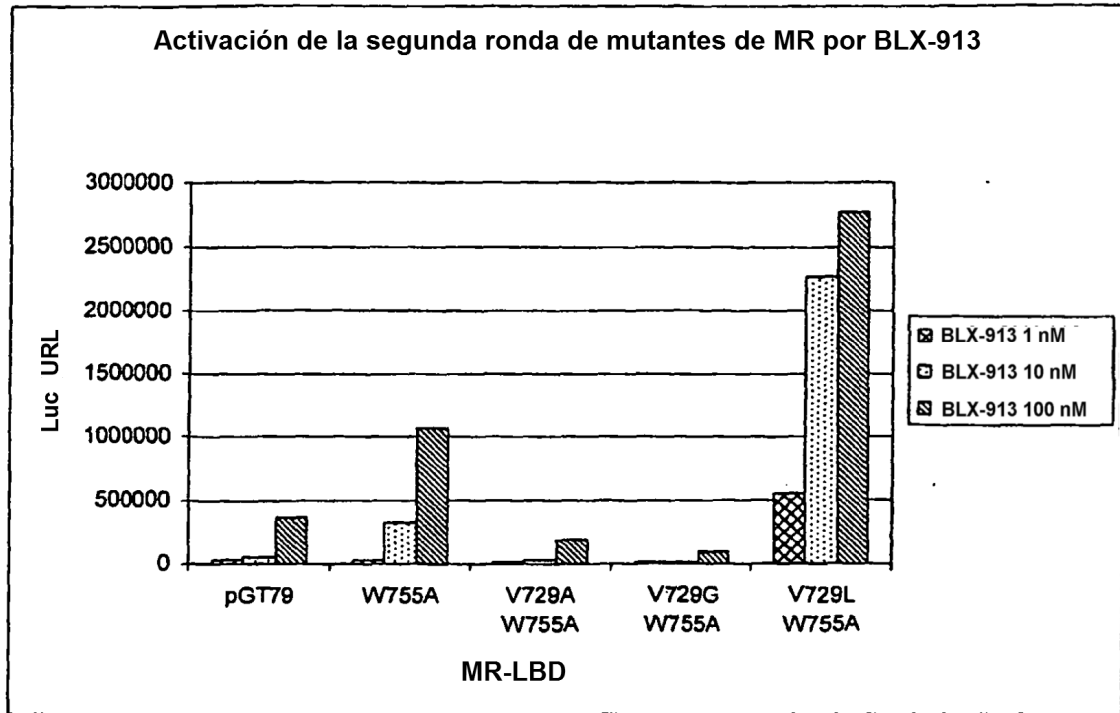
**Figura 45** Vista estéreo del modelo de homología del LBD de la MR formando complejo con MFP basándose en la estructura cristalina de rayos X del RG formando complejo con MFP (1NHZ.pdb).



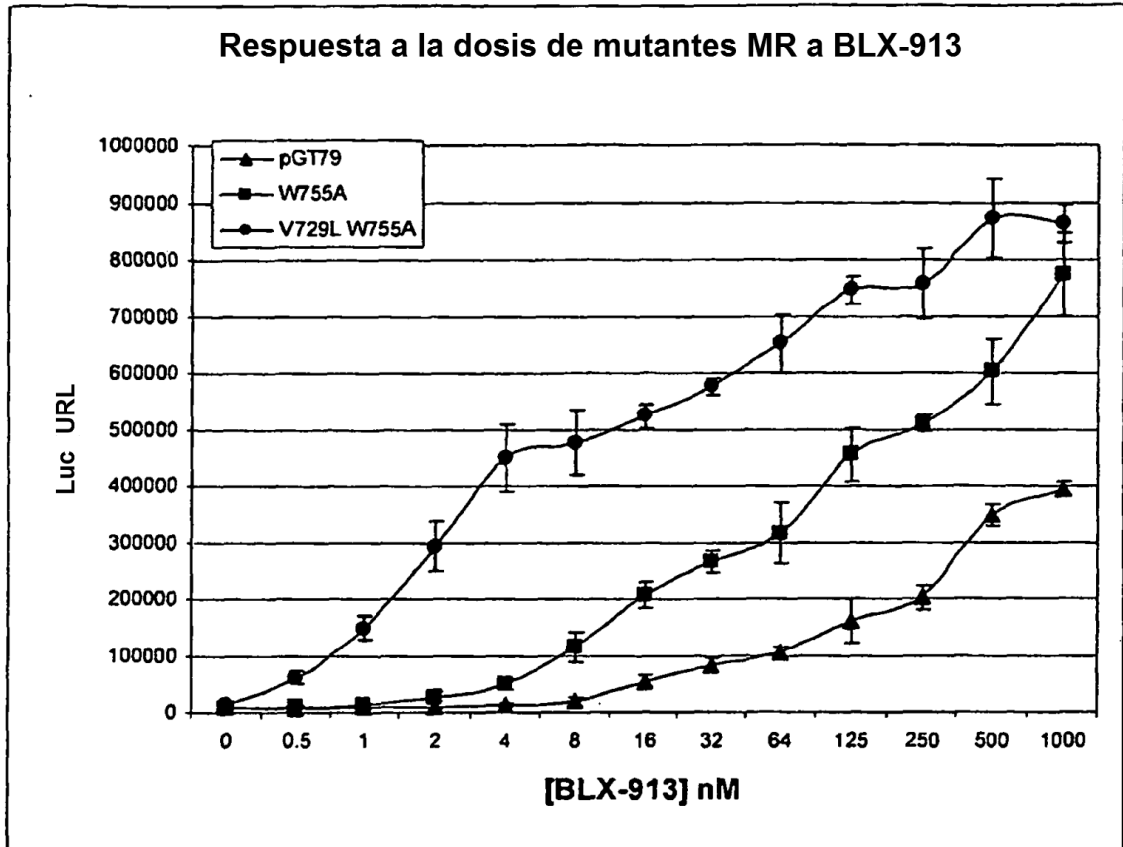
**Figura 46.** Imagen estéreo del modelo predicho de BLX-913 unido en el LBP del LBD de la MR. Los conflictos entre el sustituyente 11 $\beta$ -benzaloxima de BLX-913 y la cadena lateral del Triptófano 755 de la MR se muestran con líneas discontinuas.



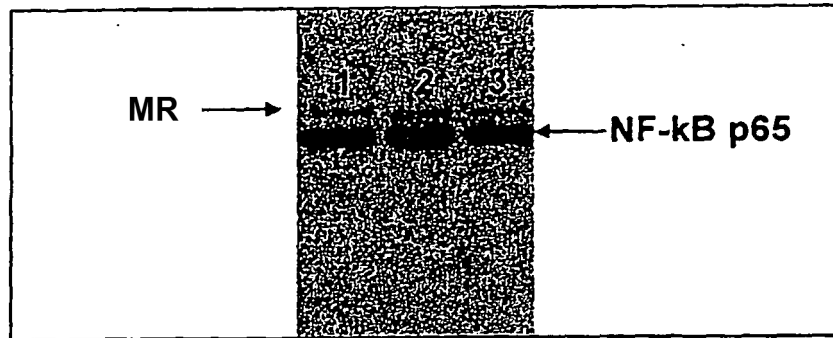
**Figura 47** Activación mejorada de la MR mutante W755A mediante BLX-913 en comparación con la de la proteína MR original. Se transfectaron temporalmente Células Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) con plásmidos pBRES-Luc que portaban mutaciones en la posición 719 o 755 junto con la construcción wt-pBRES (pGT79). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos y al día siguiente se trataron con el compuesto BLX-913 a concentraciones de 1, 10 y 100 nM. Después de las 24 horas de tratamiento se determinó el grado de activación de MR midiendo la cantidad de indicador luciferasa expresado.



**Figura 48** Activación mejorada de la MR mutante V729L/W755A mediante BLX-913 en comparación con la de la proteína MR original. Se transfectaron temporalmente Células Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) con plásmidos pBRES-Luc que portaban mutaciones en la posición 729 y/o 755 junto con la construcción wt-pBRES (pGT79). Veinticuatro horas después de la transfección, las células volvieron a sembrarse en placas de 96 pocillos y al día siguiente se trataron con el compuesto BLX-913 a concentraciones de 1, 10 y 100 nM. Después de 24 horas de tratamiento se determinó el grado de activación de MR midiendo la cantidad de indicador luciferasa expresado.



**Figura 49** Respuesta a la dosis de mutantes de MR con respecto a BLX-913. Se transfectaron temporalmente Células Renales Embrionarias Humanas (HEK 293) con plásmidos pBRES-Luc que portaban mutaciones en la posición 729 y/o 755 junto con la construcción wt-pBRES (pGT79). Veinticuatro horas después de la transfección, las células volvieron a sembrarse en placas de 96 pocillos y al siguiente día se trataron con el compuesto BLX-913 a concentraciones de hasta 1  $\mu$ M. Después de 24 horas de tratamiento se determinó el grado de activación de MR midiendo la cantidad del indicador luciferasa expresado.



**Figura 50.** Efecto de mutaciones de LBD sobre el nivel de proteína MR. Se muestra el nivel de proteína MR expresado a partir de construcciones pBRES de tipo silvestre (pGT79) (Carril 1), W755A (pGT1009) (Carril 2) y V729L/W755A (pGT1017) (Carril 3) en células HEK 293. Se resolvieron las mismas cantidades de lisados celulares que expresaban cada una de las proteínas MR en SDS-PAGE al 10 % y se visualizaron sobre la transferencia de Western usando el anticuerpo anti-NF- $\kappa$ B p65 de conejo (1:200, Santa Cruz, sc-372), que reconoce la proteína p65 endógena (65 kDa) en las células HEK 293 y la proteína MR (70 kDa).

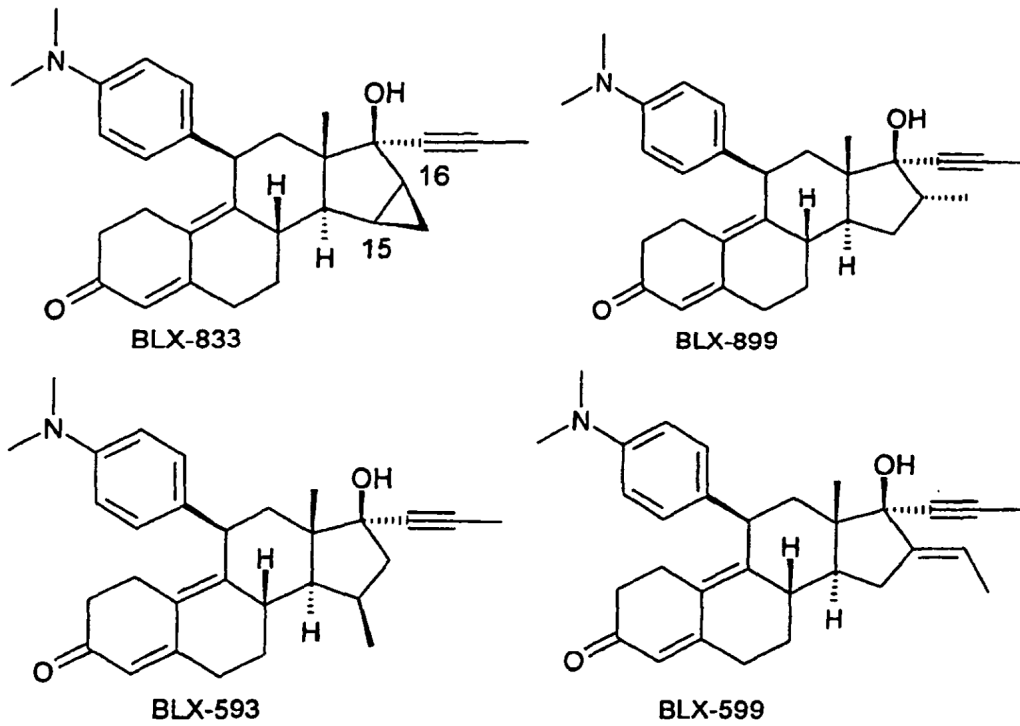
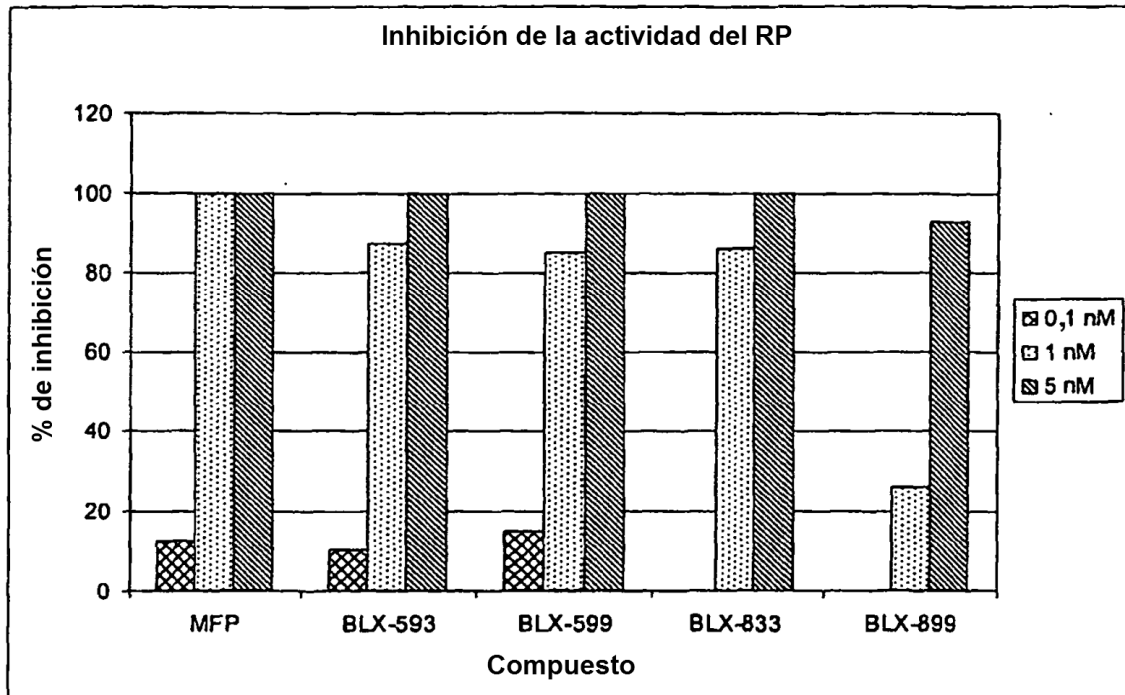


Figura 51. Estructuras de cuatro análogos de MFP con modificaciones en las posiciones 15 y 16.



**Figura 52** Inhibición de la actividad del receptor de Progesterona por los cuatro análogos de MFP con modificaciones en las posiciones 15 y 16. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se permitió su unión durante una noche. El medio de crecimiento que contenía FBS al 10 % se cambió por medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al día siguiente, las células se trataron con MFP o con compuestos de ensayo a concentraciones de 0,1, 1 y 5 nM durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, una agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad de la AP en lisados de células tratadas se midió mediante su capacidad para hidrolizar el para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG para unirse a RP e inhiben la expresión de AP en células T47D. El grado de esta inhibición se presenta como un porcentaje de inhibición con compuestos más potentes (tales como MFP) capaces de inhibir al 100 % la expresión de la AP dependiente del RP.



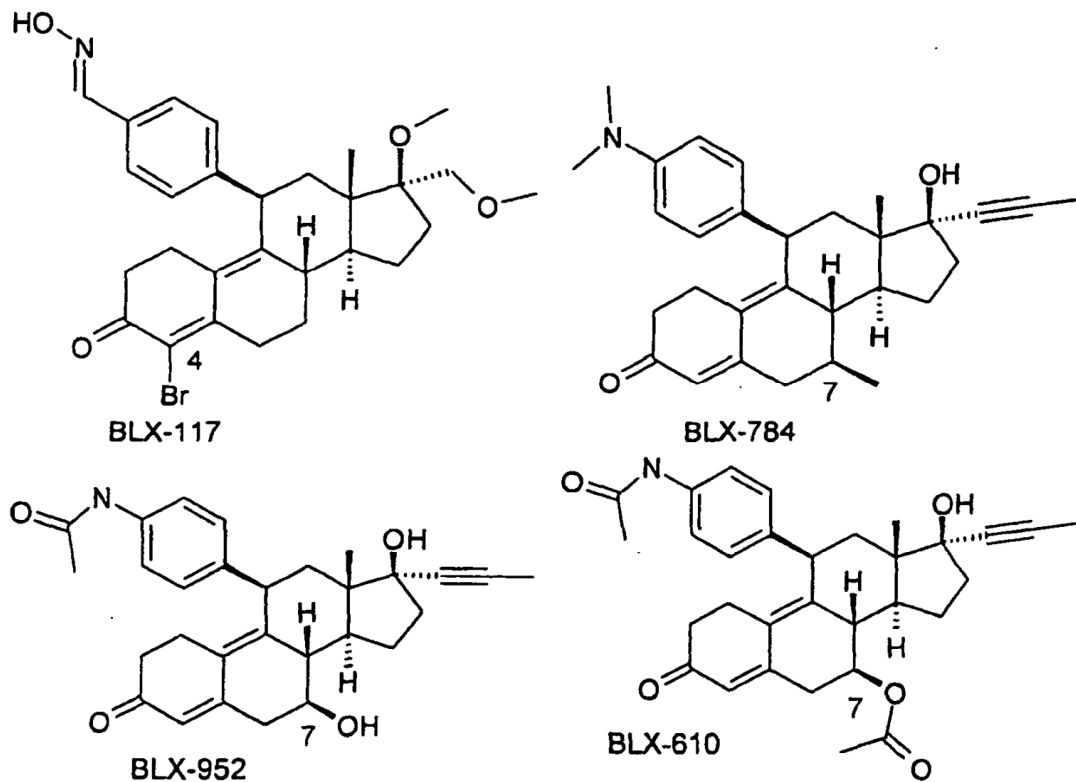
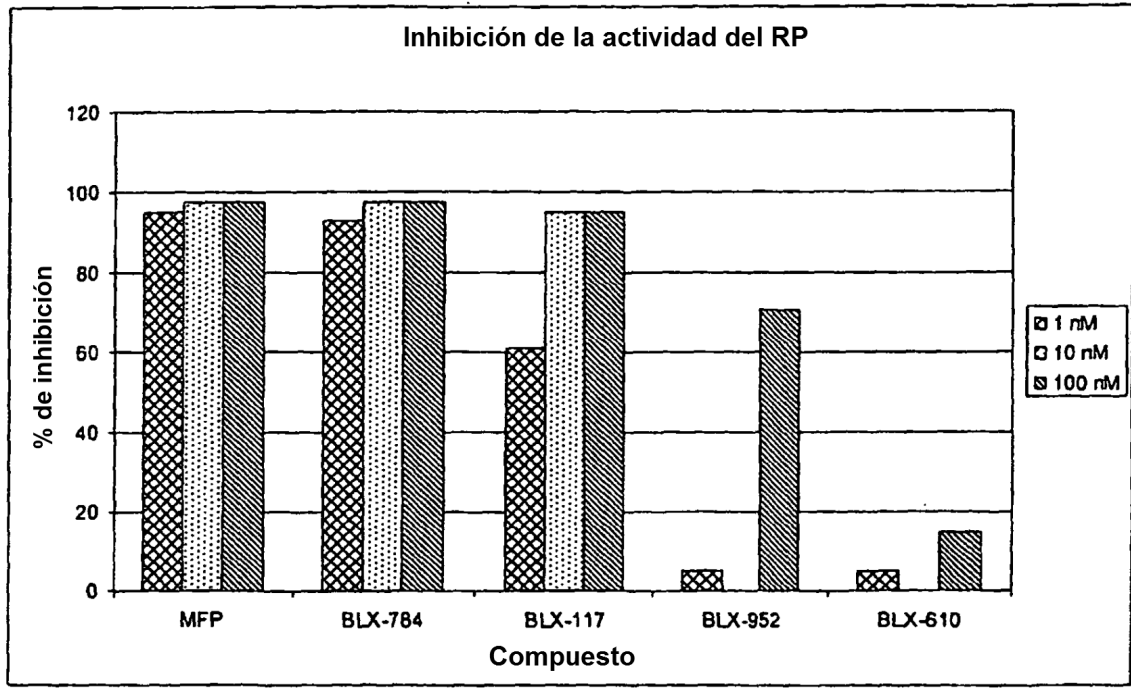


Figura 53 Estructuras de análogos de MFP y Asoprisnil con modificaciones en las posiciones 4 y 7.



**Figura 54.** Inhibición de la actividad del receptor de Progesterona por análogos con modificaciones en las posiciones 4 y 7. Se sembraron células T47D humanas ricas en RP en placas de 96 pocillos y se dejaron unirse durante una noche. El medio de crecimiento que contenía FBS al 10 % se cambió por medio de ensayo que contenía medio sin fenol y FBS tratado con carbón vegetal al 3 %. Al día siguiente, las células se trataron con MFP o con compuestos de ensayo a concentraciones de 1, 10 y 100 nM durante 24 horas en presencia de Promegestona (PMG) 200 pM, un agonista de RP que estimula la expresión de la Fosfatasa Alcalina (AP) mediante la ruta RP en células T47D. La actividad de la AP en lisados de células tratadas se midió mediante la capacidad de hidrolizar el para-Nitrofenil Fosfato en un ensayo cromogénico. Las antiprogestinas compiten con PMG para unirse al RP e inhiben la expresión de la AP en células T47D. El grado de esta inhibición se presenta como porcentaje de inhibición con compuestos más potentes (tales como MFP) capaces de inhibir al 100 % la expresión de la AP dependiente del RP.

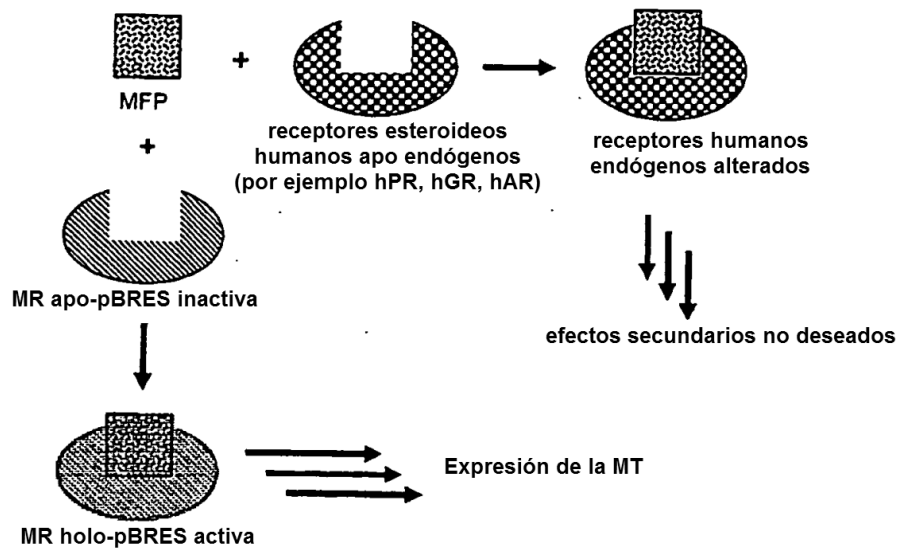


Figura 55

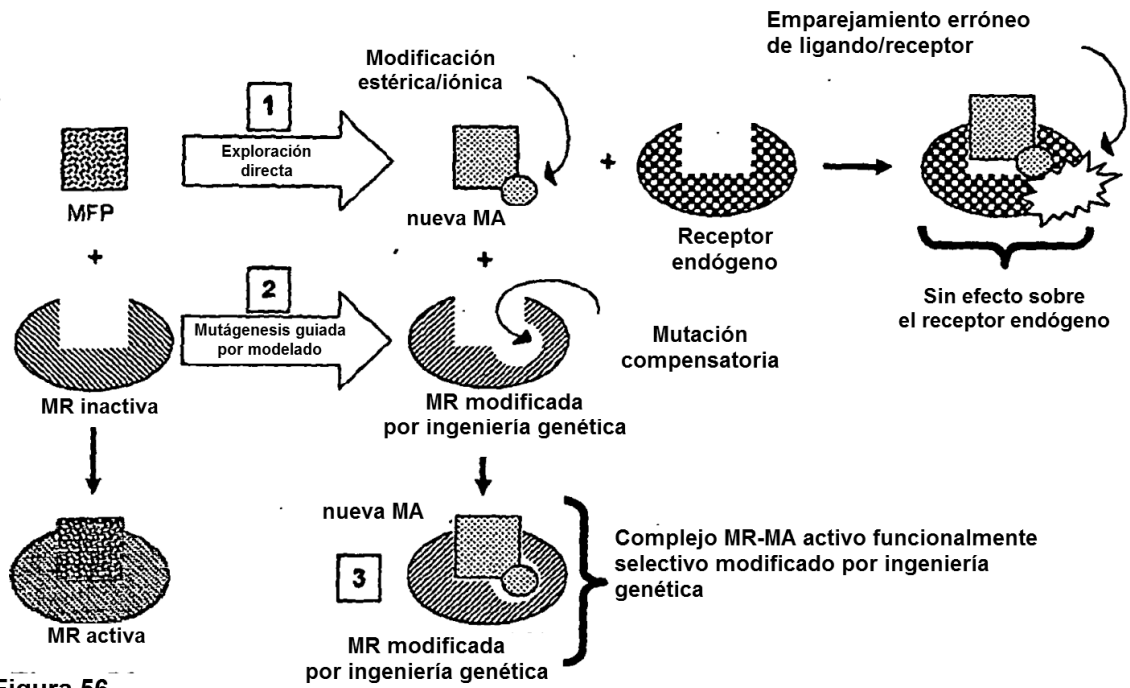


Figura 56.

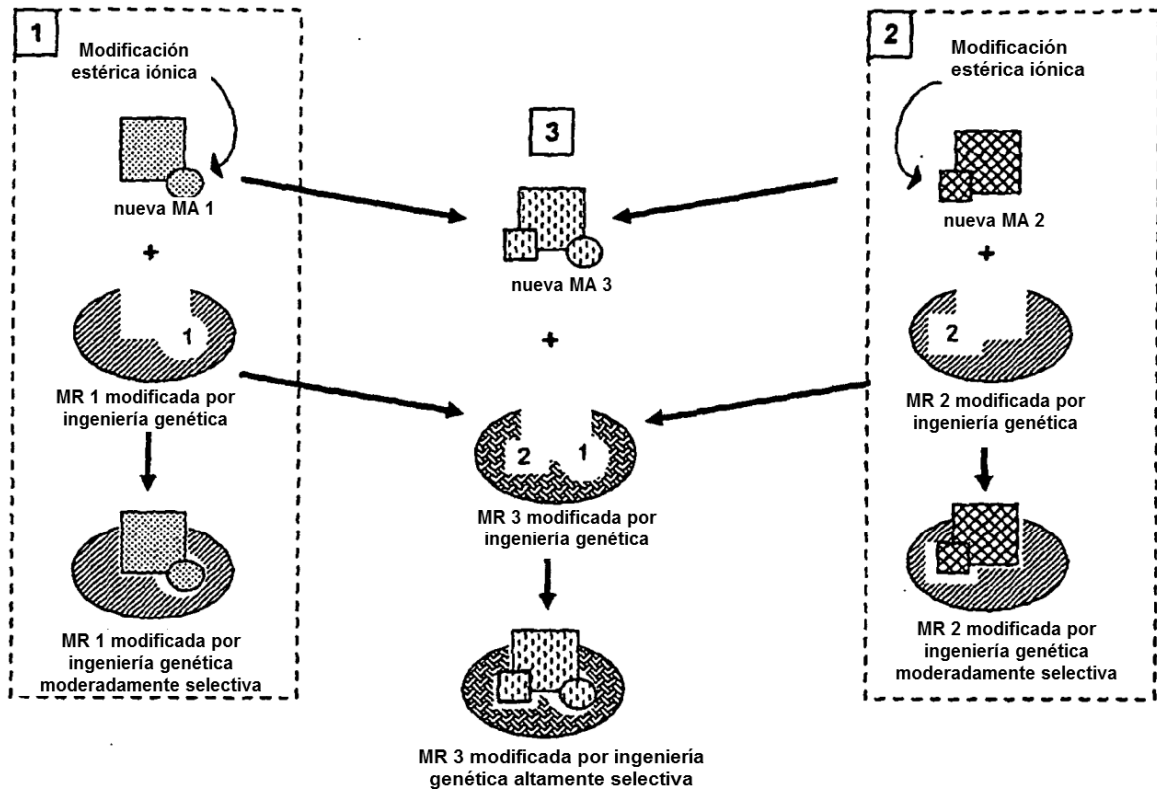


Figura 57

Fig. 58

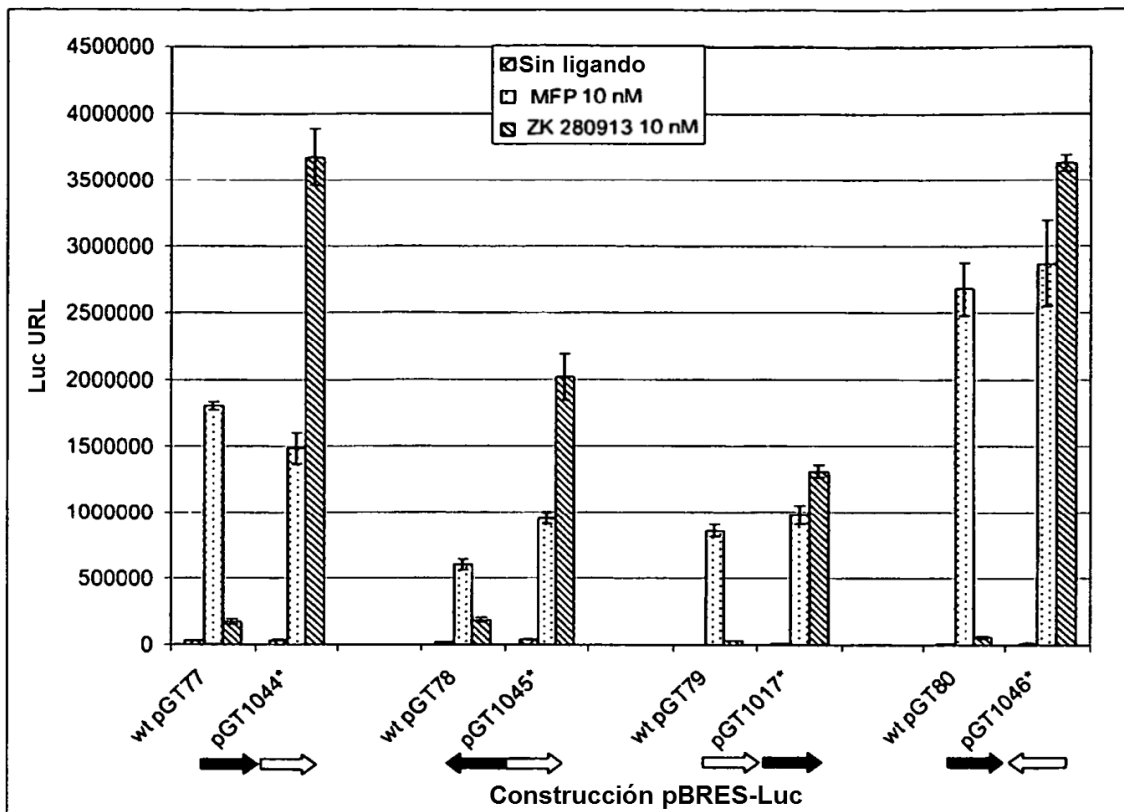


Fig. 59

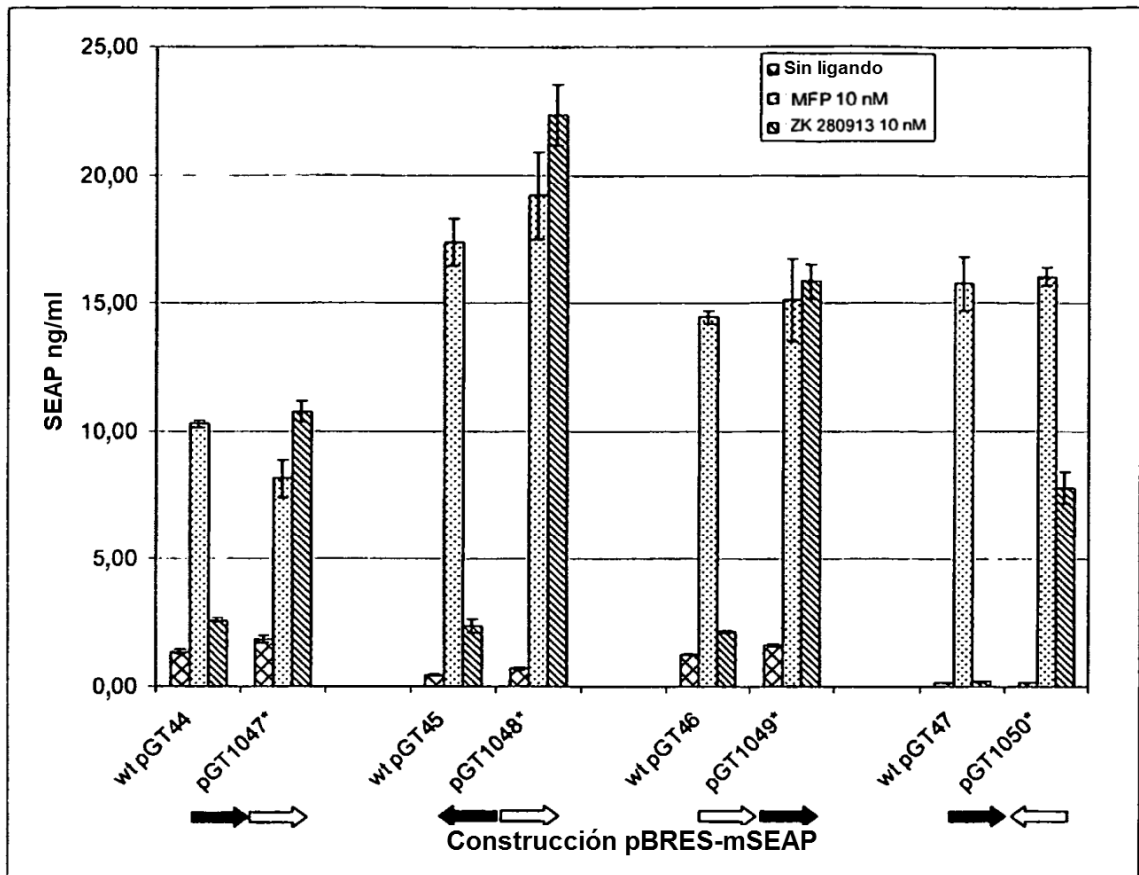


Fig. 60

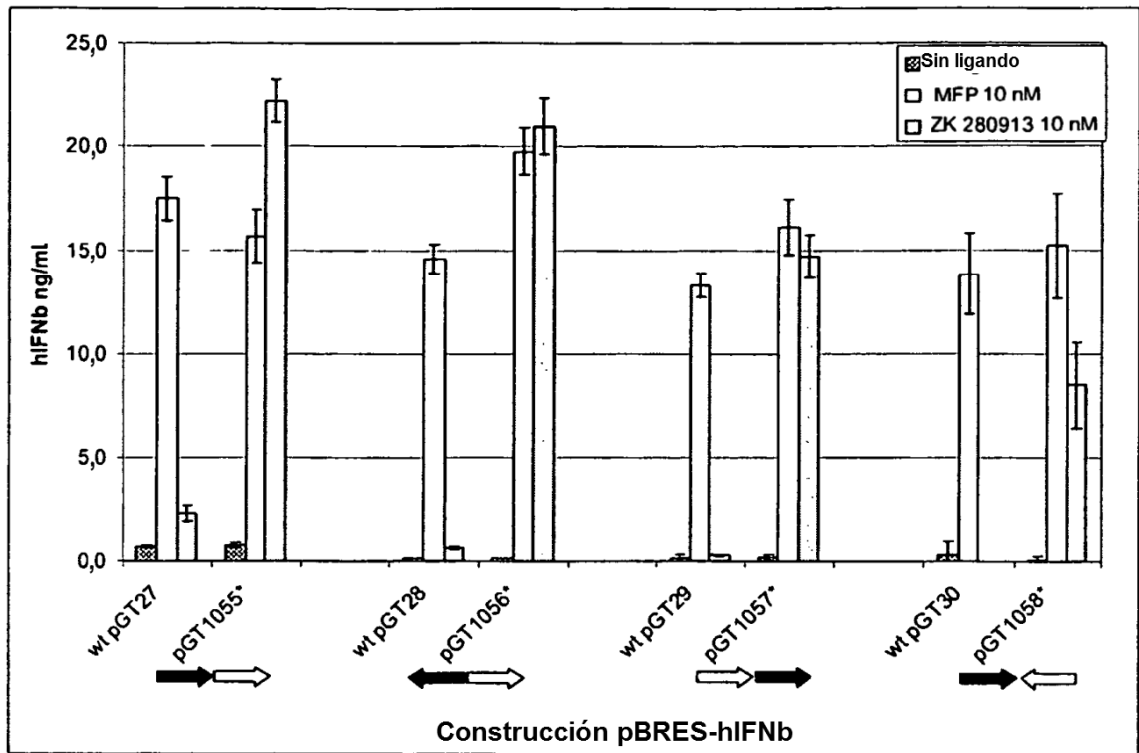




Fig. 61

