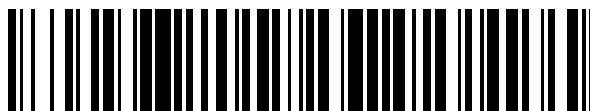


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 425**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2007** **E 07732165 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014** **EP 2007895**

54 Título: **Composiciones y métodos de terapia de la fibrosis quística**

30 Prioridad:

28.03.2006 GB 0606190

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

23.01.2015

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LTD (100.0%)
52 Princes Gate, Exhibition Road
London SW7 2PG , GB**

72 Inventor/es:

**HYDE, STEPHEN y
GILL, DEBORAH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 527 425 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

Composiciones y métodos de terapia de la fibrosis quística

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a construcciones. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las construcciones, al uso de las construcciones en la fabricación de medicamentos, así como al uso de las construcciones en diversos métodos.

10

Antecedentes de la invención

En las construcciones para la expresión génica, se usa una variedad de promotores. Con frecuencia, la elección del promotor se ve influida por el uso específico para el que se emplea la construcción. Sin embargo, en general, se desean construcciones que proporcionen una expresión de alto nivel durante un período sostenido, particularmente para aplicaciones terapéuticas, pero también para cuando se desea expresar genes para cosechar las proteínas expresadas y, en casos tales como la agricultura, para obtener características deseadas en animales de cría.

15

En el uso de construcciones en un contexto terapéutico, la expresión sostenida a un alto nivel es particularmente importante. La obtención de una expresión sostenida y de alto nivel puede significar que un determinado tratamiento se tenga que administrar con menor frecuencia y que conserve su eficacia durante más tiempo. En condiciones crónicas y en defectos genéticos heredados, esto puede cobrar una particular importancia cuando, en esencia, el defecto subyacente se traduce en la necesidad de un tratamiento continuo. Los ejemplos de dichas condiciones incluyen la fibrosis quística, donde el tratamiento puede tener que administrarse de manera permanente y, por tanto, cualquier medio para aumentar el intervalo entre los tratamientos es importante.

20

25

Las construcciones de expresión génica pueden adolecer de una variedad de problemas. En algunos casos, la expresión puede ser solo por un breve período de tiempo antes de su silenciamiento. Esto ocurre particularmente *in vivo* y en una variedad de tejidos. Además, o como alternativa, algunas construcciones solo dan lugar a una expresión muy débil e inadecuada para lograr el efecto deseado.

30

Un problema adicional con algunas construcciones para la expresión génica cuando se emplean *in vivo* es que pueden activar el sistema inmune del sujeto de una manera no deseada. Por lo tanto, un sujeto puede presentar una respuesta inmune contra determinadas construcciones de expresión de genes virales que limitan su eficacia, especialmente cuando se usan repetidamente en el mismo sujeto, que puede ser el caso descrito anteriormente para muchas afecciones.

35

Breve descripción de los dibujos

40

La Figura 1 representa la estructura de la construcción pGM160 en la que se pueden clonar secuencias para la expresión a partir del promotor hCEFI.

La Figura 2 representa la estructura de la construcción pGM151 en la que las secuencias de codificación para el polipéptido CFTR se clonan en la unión operativa con el promotor hCEFI.

La Figura 3 representa la estructura de la construcción pGM144 en la que las secuencias de codificación para el polipéptido indicador de luciferasa se clonan en la unión operativa con el promotor hCEFI.

45

La Figura 4a representa niveles de síntomas gripales e inflamación pulmonar tras la administración a ratones de construcciones con contenido de dinucleótidos CpG decreciente con, de izquierda a derecha en cada gráfico, 317 dinucleótidos CpG, 193 dinucleótidos CpG, 0 dinucleótidos CpG y ratones de control a quienes no se ha administrado una construcción. Se muestran los niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-12, así como el número de neutrófilos del BALF (fluido pulmonar de lavado broncoalveolar). La Figura 4b muestra el efecto de la adición de un solo motivo CpG a una construcción en la respuesta inflamatoria a la construcción en el pulmón de un ratón.

50

Más concretamente, la Figura 4b muestra el efecto de la adición de un solo dinucleótido CpG a una construcción sin dinucleótidos CpG. De izquierda a derecha en cada gráfico, se muestran los resultados para una construcción con 317 dinucleótidos CpG, un solo dinucleótido CpG, ningún dinucleótido CpG y los ratones de control sin tratar.

55

La Figura 4c muestra que la sustitución del gen Lux con un gen CFTR sin dinucleótidos CpG no tiene ningún efecto sobre la respuesta inflamatoria observada.

La Figura 5 muestra los niveles de expresión en el pulmón a lo largo del tiempo tras la administración en aerosol GL67 de las construcciones pG4hCEFI soLux (expresión desde un promotor hCEFI de la invención), pG4GZB soLux (emplea el potenciador y promotor CMV humano), pG4mCEFI soLux (emplea el potenciador CMV murino y la promotor EFla humano), pG2Ubc Lux (emplea el promotor poliubiquitina C humano) y pG1 CMV lux (que emplea el promotor y el potenciador CMV-IE).

60

La Figura 6 muestra los niveles de expresión en el pulmón a lo largo del tiempo tras la administración en aerosol PEI de las construcciones pG4 hCEFI soLux, pG4GZB soLux, pG4mCEFI soLux y pG3mCEFI soLux.

65

Las Figuras 7a y b muestran vectores de primera, segunda, tercera y cuarta generación, con el número de dinucleótidos CpG representado en forma de piruletas e indicado en el centro de cada construcción.

La Figura 8 muestra los niveles de expresión en el pulmón a lo largo del tiempo tras la administración en aerosol GL67 de las construcciones pG2EF1a Lux (emplea el promotor EF1a y tiene 245 CpG), pG2CEF1a Lux (emplea el potenciador CMV humano y el promotor EF1a, y tiene 262 CpG), pG2hCEFI Lux (emplea un potenciador CMV humano sin CpG y un promotor EF1a humano, la construcción tiene 149 CpG) y pG4hCEFI soLux (emplea un potenciador CMV humano sin CpG y un promotor EF1a humano y toda la estructura carece de CpG).

La Figura 9 muestra los niveles de expresión en el pulmón durante 56 días tras la administración en aerosol GL67 de las construcciones pG4hCEFI soLux y pG4EF1 soLux (emplea un promotor EF1a humano sin CpG y la construcción entera carece de CpG).

10 Breve descripción de las secuencias

La SEC ID N° 1 es la secuencia de polinucleótido de la construcción pGM160 para la clonación de secuencias para la expresión usando el promotor hCEFI.

15 La SEC ID N° 2 es la secuencia de polinucleótido de la construcción pGM151, que incluye las secuencias de codificación para CFTR que no contienen dinucleótidos CpG y que también se han optimizado en codones para la expresión (soCFTR). La invención también permite una secuencia de polinucleótidos alternativa de CFTR en la que el nucleótido 2595 es C, el nucleótido 3234 es T y el nucleótido 3236 es C.

20 La SEC ID N° 3 es la secuencia polipeptídica del polipéptido CFTR codificada por la construcción pGM151 de SEC ID N° 2. La invención también permite una secuencia polipeptídica alternativa de CFTR en la que el aminoácido 620 es H (histidina) y el aminoácido 833 es F (fenilalanina).

25 La SEC ID N° 4 es la secuencia de polinucleótido de la construcción pGM144, que incluye las secuencias de codificación para un polipéptido de luciferasa, que no contiene dinucleótidos CpG y que también se han optimizado en codones para la expresión (soLux).

La SEC ID N° 5 es la secuencia polipeptídica del polipéptido luciferasa codificado por la construcción pGM144 de la SEC ID N° 4.

30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia potenciadora y promotora unida operativamente a una secuencia para la expresión, en la que la secuencia potenciadora y promotora comprende:

- (i) una secuencia de los nucleótidos 7 a 538 de SEC ID N° 1; o
- (ii) una secuencia de al menos 200 nucleótidos de (i); o
- (iii) una secuencia de al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i).

40 en la que la secuencia potenciadora y promotora comprende menos de 15 dinucleótidos CpG.

La construcción puede ser una construcción plasmídica.

45 En la construcción, la secuencia potenciadora y promotora puede no comprender dinucleótido CpG alguno.

La construcción puede no comprender dinucleótido CpG alguno.

En la construcción, la secuencia para la expresión puede codificar un polipéptido terapéutico.

50 En la construcción, la secuencia por expresar puede codificar un polipéptido CFTR, donde la construcción comprende:

- (i) la secuencia de SEC ID N° 2 o la secuencia de SEC ID N° 2 en la que el nucleótido 2595 es C y/o el nucleótido 3234 y 3236 son T y C respectivamente; o
- (ii) una construcción con al menos un 70 % de identidad de secuencia con (i).

60 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una construcción de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la construcción de la invención es para usarla en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o cirugía, o para usarla como un medicamento.

65 En otro aspecto adicional, la invención proporciona el uso de una construcción de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno genético, una afección crónica, cáncer,

alergia, autoinmunidad, infección o un cáncer. La enfermedad por tratar puede ser un trastorno de las vías respiratorias.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método no terapéutico de expresión de una secuencia en un sujeto animal no humano, método que comprende la administración de una construcción de acuerdo con la invención, en la que la secuencia potenciadora y promotora está unida operativamente a una secuencia no terapéutica para la expresión.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia, o el complemento de una secuencia, seleccionada del grupo que comprende:

- (i) la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 738 a 5180 de SEC ID N° 2; y
- (ii) la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 738 a 5180 de SEC ID N° 2, en la que el nucleótido 2595 se cambia de A a C y/o los nucleótidos 3234 y 3236 se cambian de C a T y de G a C, respectivamente.

15 En un aspecto adicional más, la invención proporciona un método *in vitro* o *ex vivo* de expresión de un gen en una célula, un tejido o un órgano, método que comprende la introducción de una construcción de acuerdo con la invención en dicha célula, tejido u órgano.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una secuencia potenciadora y promotora aislada, en el que la secuencia potenciadora y promotora es como se define en el presente documento.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción que comprende una secuencia potenciadora y promotora unida operativamente a un sitio de restricción, en el que:

- 25 (i) la secuencia potenciadora y promotora es como se define en el presente documento; y
- (ii) la inserción de secuencias de codificación en el sitio de restricción producirá su unión operativa a la secuencia potenciadora y promotora.

30 También se describen promotores hCEFI que comprenden un potenciador CMV humano unido operativamente a un promotor EF1a humano, fragmentos funcionales del mismo o variantes funcionales de cualquiera de ellos. En un caso particularmente preferido, los promotores hCEFI se han modificado para reducir el número de, o eliminar todos, los dinucleótidos CpG.

35 Se ha observado que los promotores hCEFI dan lugar a niveles inesperadamente elevados y sostenidos de expresión. Por lo tanto, el promotor hCEFI de la invención es particularmente útil para construcciones destinadas a la expresión génica. Así pues, las construcciones de la invención son preferentemente construcciones de expresión génica. La invención también proporciona construcciones que se han optimizado más para la expresión génica y, en particular, para su uso terapéutico, mediante la eliminación o la reducción del número de dinucleótidos CpG para reducir las respuestas inmunes no deseadas.

40 Por lo tanto, la presente descripción proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende un promotor hCEF1 unido operativamente a una secuencia para la expresión, donde el promotor hCEF1 comprende:

- 45 (i) un potenciador CMV humano unido operativamente a un promotor EF1a humano;
- (ii) un fragmento funcional de (i); o
- (iii) una variante funcional de (i) o (ii).

La presente invención proporciona además:

- 50 - una composición farmacéutica que comprende una construcción de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable;
- una construcción de la invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o cirugía; y
- 55 - uso de la construcción de la presente invención en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno genético, una afección crónica, alergia, autoinmunidad, infección o un cáncer.

La descripción comprende además un método de tratamiento de un trastorno que comprende administrar una construcción de la descripción en una cantidad eficaz a un sujeto que padece dicho trastorno.

60 La invención también proporciona:

- un método no terapéutico de expresión de una secuencia en un sujeto, método que comprende administrar una construcción de la invención, en la que el promotor hCEFI está unido operativamente a una secuencia no terapéutica para la expresión;
- 65 - un método *in vitro* o *ex vivo* de expresión de un gen en una célula, un tejido o un órgano, método que comprende la introducción de una construcción de la invención en dicha célula, tejido u órgano; y

- un promotor hCEFI aislado para la descripción.

La invención también proporciona una construcción que comprende un promotor hCEFI unido operativamente a un sitio de restricción, en el que la inserción de secuencias de codificación en el sitio de restricción dará lugar a su enlace operativo con el promotor hCEFI.

La invención también proporciona un animal no humano que comprende un promotor hCEFI de la invención.

Descripción detallada de la invención

Antes de describir la presente invención detalladamente, se ha de entender que la presente invención no se limita a las moléculas ni a los parámetros de proceso ilustrados en particular, pues, como es evidente, pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en el presente documento solo tiene el fin de describir realizaciones particulares de la invención, y no se pretende que sea limitante. Además, la práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de virología, microbiología, biología molecular, técnicas de ADN recombinante e inmunología, perteneciendo todos ellos al alcance de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (II edición, 1989); "DNA Cloning: A Practical Approach", vol. I y II (D. Glover, ed.); "Oligonucleotide Synthesis" (N. Gait, ed., 1984); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984); y "Fundamental Virology", II edición, vol. I y II (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.).

Cabe señalar que, como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "un", "uno", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

En los casos donde se especifica que un agente en particular comprende determinadas unidades, en un caso preferido, el agente puede consistir esencialmente en dichas unidades.

Visión general de conjunto

La invención se refiere, en particular, a construcciones que permiten la expresión eficaz de secuencias debido a la presencia del promotor hCEFI. Las construcciones proporcionan altos niveles de expresión y, lo que es más importante, la expresión sostenida. Esto hace que las construcciones sean adecuadas para cualquier aplicación donde se deseen expresar secuencias particulares, especialmente en la expresión de secuencias para tratar trastornos, particularmente aquellas en las que se requiera una expresión génica sostenida. Debido a la longitud de expresión observada con el uso de las construcciones de la invención, puede ser que las construcciones se puedan administrar con menor frecuencia y/o que den lugar a mejores resultados donde el nivel de expresión con otras construcciones sería de corta duración y/o de una magnitud demasiado baja.

En particular, las construcciones son construcciones de ácidos nucleicos. La expresión "molécula de ácido nucleico" y el término "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. En un ejemplo particularmente preferido, las construcciones de la invención comprenden ADN y, preferentemente, son construcciones de ADN.

La invención proporciona construcciones que comprenden, o en algunas realizaciones, que consisten esencialmente en una secuencia de promotor hCEFI y un sitio de clonación, de manera que cuando se inserta una secuencia de codificación en el sitio de clonación, la secuencia de codificación está en unión operativa con el promotor. La invención también proporciona construcciones con secuencias para la expresión insertadas en el sitio o los sitios de clonación. Las secuencias que se expresan pueden ser, en particular, secuencias de codificación. Las secuencias de codificación pueden codificar cualquiera de los polipéptidos mencionados en el presente documento.

Las construcciones de la invención se pueden emplear en una variedad de composiciones farmacéuticas, vacunas, en la fabricación de medicamentos y también en una serie de métodos.

El promotor hCEFI

Las diversas construcciones de la invención emplean el promotor hCEFI. El promotor hCEFI da lugar a la expresión prolongada y de alto nivel de secuencias, y comprende:

- (i) un potenciador CMV humano unido operativamente a un promotor EF1a humano;
- (ii) un fragmento funcional de (i); o
- (iii) una variante funcional de (i) o (ii).

"Unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Así pues, un promotor unido operativamente a una secuencia de

ácido nucleico es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia cuando las enzimas apropiadas están presentes. El promotor hCEFI no necesita estar contiguo a la secuencia, siempre y cuando funcione para dirigir la expresión de la misma. Así pues, la secuencia que se expresa se transcribirá debido al promotor hCEFI. En un caso preferido, cualquiera de los componentes descritos en el presente documento estará en unión operativa cuando esté presente en una construcción de la invención.

En una realización preferida, el promotor hCEFI, por lo tanto, es un material compuesto de un potenciador CMV humano ligado a un promotor EF1a humano, aunque también se pueden emplear fragmentos funcionales de los mismos y variantes funcionales de los mismos. Se ha encontrado inesperadamente que el uso del potenciador CMV humano ligado al promotor EF1a humano da lugar a una expresión elevada y, en particular, sostenida.

En algunas realizaciones, se puede emplear un potenciador CMV humano en combinación con un fragmento funcional o variante funcional de un promotor EF1a humano. En otras realizaciones, se puede emplear un fragmento funcional o variante funcional de un potenciador CMV humano con un promotor EF1a humano. En otras realizaciones, se puede emplear un fragmento o variante funcional de un potenciador CMV humano con un fragmento o variante funcional de un promotor EF1a humano.

El promotor hCEFI es para la expresión eucariota. Los promotores hCEFI de la invención son funcionales en células de mamífero y se pueden usar para la expresión en células de mamífero. El hCEFI también se puede usar para la expresión en aves. Por lo tanto, las construcciones de la invención expresarán las secuencias para la expresión unidas operativamente al promotor hCEFI en células eucariotas, en particular, células de mamíferos y células de ave y, preferentemente, en células de mamífero. En un ejemplo particularmente preferido, se usarán para la expresión en células humanas.

En un ejemplo particularmente preferido, el promotor hCEF1 puede comprender la secuencia de nucleótidos 7 a 538 de la SEC ID N° 1, un fragmento funcional de la misma o una variante funcional de cualquiera. Un fragmento funcional puede ser, por ejemplo, de al menos 200, preferentemente de al menos 300, incluso más preferentemente de al menos 400 e incluso más preferentemente de al menos 500 nucleótidos de longitud. Una variante funcional puede, por ejemplo, tener al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, incluso más preferentemente al menos un 80 % y todavía más preferentemente al menos un 90 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 7 a 538 de SEC ID N° 1. En un caso preferido, una variante funcional puede tener al menos un 92 %, preferentemente al menos un 95 %, incluso más preferentemente al menos un 97 % e incluso más preferentemente al menos un 99 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 7 a 538 de la SEC ID N° 1. Dicha identidad de secuencia puede ser a lo largo de cualquiera de las longitudes especificadas en el presente documento, por ejemplo, a lo largo de al menos 20, preferentemente al menos 50, más preferentemente al menos 100, incluso más preferentemente al menos 300 e incluso más preferentemente a lo largo de toda la longitud de la secuencia en cuestión.

Cualquiera de las longitudes de los fragmentos y de los niveles de identidad de secuencia a los que se hace referencia en el presente documento puede definir los fragmentos y las variantes funcionales. Los fragmentos y las variantes serán funcionales. En una realización preferida, darán al menos un 10 %, preferentemente al menos un 25 %, incluso más preferentemente al menos un 50 %, todavía más preferentemente al menos un 75 % e incluso más preferentemente al menos un 90 % de la expresión del promotor de los nucleótidos 7 a 538 de la SEC ID N° 1. En algunos casos, el nivel de expresión puede ser superior y puede ser al menos el doble, triple, cuádruplo o más de la expresión observada con los nucleótidos 7 a 538 de la SEC ID N° 1. La duración de la expresión también puede ser, por ejemplo, cualquiera de los niveles especificados, tales como al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 90 % de la observada con los nucleótidos 7 a 538 de la SEC ID N° 1 o puede ser, por ejemplo, al menos el doble, triple o cuádruplo de la observada con los nucleótidos 7 a 538 de la SEC ID N° 1. En un caso preferido, el nivel y la duración de la expresión pueden tener cualquiera de las magnitudes anteriores especificadas en comparación con la expresión usando el promotor de los nucleótidos 7 a 538 de la SEC ID N° 1.

La funcionalidad de los fragmentos y de las variantes se puede evaluar en cualquier sistema de ensayo adecuado. En un caso preferido, se evalúa la misma construcción aparte del cambio en el promotor. El promotor objeto del ensayo puede ser, por ejemplo, un fragmento o una variante del promotor original de la construcción. En un caso preferido, se compara la expresión entre la construcción de SEC ID N° 2 o 4 y la construcción equivalente, pero con los nucleótidos 7 a 538 sustituidos con el fragmento o la variante objeto del ensayo. En un caso, la construcción objeto del ensayo puede comprender el gen de la luciferasa de los nucleótidos 738 a 2390 de SEC ID N° 4, un fragmento funcional del mismo o una variante funcional de cualquiera y, para determinar la funcionalidad, se puede medir la expresión de la luciferasa. En una realización, se emplea la construcción de SEC ID N° 1, pero que ha tenido una secuencia para la expresión y, en particular, una secuencia de codificación clonada en ella, incluyendo cualquiera de las mencionadas en el presente documento.

Para evaluar la funcionalidad, se puede usar cualquier sistema adecuado. Se puede usar un sistema *in vitro* incluyendo cualquiera de los tipos de células medidos en el presente documento. En un caso particularmente preferido, se puede usar un sistema *in vivo* y, en particular, un animal no humano para evaluar la funcionalidad. Se puede usar cualquiera de los animales no humanos y, en particular, los mamíferos no humanos mencionados en el

presente documento. Se pueden emplear roedores y, en particular, ratones. En la evaluación de la funcionalidad, se puede emplear cualquiera de las vías de administración mencionadas en el presente documento y, en una realización preferida, se pueden emplear la administración en el pulmón, en particular, a través de la administración en aerosol y, en particular, la administración en aerosol que emplea liposomas y, preferentemente, liposomas catiónicos o polímeros catiónicos. La formulación de liposomas puede ser cualquiera de las mencionadas en el presente documento. En particular, se puede usar una formulación de liposomas GL67. En el caso de los polímeros catiónicos, PEI es una elección particularmente preferida para la formulación.

En un caso preferido, los complejos de una construcción de la invención, y los liposomas catiónicos o los polímeros catiónicos se administran en los pulmones de los ratones en forma de aerosoles, y la expresión se mide durante al menos 7, preferentemente al menos 14, más preferentemente al menos 14, incluso más preferentemente al menos 21 e incluso más preferentemente al menos 28 días, todavía más preferentemente al menos 56 días. La expresión se puede medir, por ejemplo, en cualquiera de dichos puntos temporales, todos los puntos temporales y así sucesivamente. Dichas duraciones se pueden usar en cualquiera de las formas de evaluación de la funcionalidad descritas en el presente documento. En dicha evaluación, se puede emplear cualquiera de los animales no humanos y vías de expresión que se mencionan en el presente documento. En un caso preferido, se mide la expresión de la luciferasa.

La expresión alta y sostenida observada con el empleo del promotor hCEFI significa que las construcciones de la invención encuentran una amplia selección de usos. El nivel de expresión alto y sostenido fue inesperado, ya que las construcciones previas de la técnica anterior existían empleando el potenciador CMV murino y no se dio indicación alguna de que el potenciador CMV murino realizara otra cosa que no fuera óptima en células humanas y diera lugar a una expresión sostenida. Sorprendentemente, por lo tanto, el potenciador CMV humano en tándem con el promotor EF1a humano genera expresión muy superior y sostenida en comparación con dichas construcciones de la técnica anterior.

En un caso preferido adicional, los promotores hCEFI de la invención tienen un contenido bajo o nulo de dinucleótidos CpG. La ausencia de dinucleótidos CpG mejora aún más el rendimiento de las construcciones de la invención y, en particular, en situaciones donde no se desea generar una respuesta inmune contra un antígeno expresado o una respuesta inflamatoria contra la construcción de expresión administrada. La eliminación de los dinucleótidos CpG reduce la aparición de síntomas gripales y la inflamación que pueden derivarse de la administración de las construcciones, especialmente cuando se administran en las vías respiratorias.

La presente invención también proporciona cualquiera de los promotores hCEFI anteriormente mencionados en forma aislada, así como un ácido nucleico que comprende el promotor hCEFI. En un caso preferido, el promotor hCEFI está presente en una construcción de la invención.

Variantes, fragmentos e identidad de secuencia

En las construcciones de la descripción, se puede emplear una serie de elementos. En las construcciones de la presente descripción, se pueden emplear fragmentos funcionales y variantes funcionales de secuencias específicas. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de SEC ID N° 1 a 5 proporcionan la secuencia de varios elementos específicos. Sin embargo, se pueden emplear los fragmentos funcionales de dichas secuencias específicas, así como las variantes funcionales de cualquiera de los dos. Lo mismo se aplica a cualquiera de los elementos, polipéptidos y otros números enteros a los que se hace referencia en el presente documento.

Las variantes de una secuencia específica se pueden definir en referencia a un grado de identidad u homología de secuencia con la secuencia específica a la que se hace referencia en el presente documento. En algunos casos, el nivel de identidad de secuencia puede ser de al menos un 25 %, preferentemente al menos un 30 %, más preferentemente al menos un 50 %, incluso más preferentemente al menos un 60 % e incluso más preferentemente al menos un 75 %. En algunos casos, el nivel de identidad de secuencia puede ser de al menos un 80 %, más preferentemente de al menos un 90 %, incluso más preferentemente de al menos un 95 %, aún más preferentemente de al menos un 97 % y, en algunos casos, de al menos un 99 %. Por lo tanto, siempre que se haga referencia a la identidad de secuencia en el presente documento, se pueden aplicar, por ejemplo, dichos niveles de identidad.

La longitud en la que se da dicha identidad de secuencia puede ser, por ejemplo, superior a al menos 15, preferentemente al menos 30, por ejemplo, al menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos. La región de homología puede darse a lo largo de al menos 150, preferentemente de al menos 200 e incluso más preferentemente de al menos 300 nucleótidos. En algún caso, el nivel de identidad de secuencia puede darse a lo largo de al menos un 25 %, más preferentemente de al menos un 50 %, aún más preferentemente de al menos un 75 % e incluso más preferentemente de al menos un 95 % de la longitud del elemento o de la construcción en cuestión. En un caso particularmente preferido, el nivel de identidad de secuencia se da a lo largo de toda la longitud del elemento o construcción en cuestión. En referencia a los polipéptidos, pueden estar presentes, por ejemplo, los mismos niveles y longitudes de identidad de secuencia.

Los métodos de medición de la homología o identidad de polinucleótidos y polipéptidos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT, que se puede usar para calcular la homología (por ejemplo, usado en su configuración por defecto) (Devereux *et al.* (1984) "Nucleic Acids Research" 12, pág. 387-395).

5 También se pueden usar los algoritmos PILEUP y BLAST para calcular la homología o alinear secuencias (por lo general, en su configuración por defecto), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S., F *et al* (1990) *J Mol Biol* 215:403-10.

10 El programa informático para realizar el análisis BLAST está disponible para el público en general a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dicho algoritmo implica identificar primero el par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden con o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul *et al, supra*). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineación acumulativa se pueda aumentar. Las extensiones para los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, las alineaciones (B) de la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 10915-10919) de 50, la expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas.

25 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU.* 90: 5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en la comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es inferior a aproximadamente 1, preferentemente inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01 y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

35 En algunos casos, una variante puede diferir de una secuencia específica en 100 o menos, 50 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 3 o menos o 2 o menos cambios (pudiendo ser cada uno de los cuales una sustitución, duplicación, delección o inserción) o más de dichos números de cambios. En algunos casos, puede haber solo un único cambio. Estas mutaciones se pueden medir sobre una región de al menos 30, por ejemplo de al menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos de los elementos en cuestión y, en particular, en toda su longitud. Puede haber niveles similares de cambios en las secuencias de polipéptidos. En un caso preferido, la variación en cuestión no introducirá dinucleótidos CpG en las secuencias de nucleótidos en cuestión.

45 Cuando un polinucleótido codifica un polipéptido, las sustituciones pueden crear preferentemente cambios "conservadores" en el aminoácido codificado. Estos se definen de acuerdo a la Tabla 1 que figura a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferentemente de la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre sí en cambios conservadores.

Tabla 1

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar no cargado	C S T M
		N Q
	Polar cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

50 En algunos casos, se pueden emplear fragmentos funcionales de determinados números enteros mencionados en el presente documento. El término "fragmento" indica una parte más pequeña de una entidad mayor. En la descripción, se pueden emplear fragmentos de elementos específicos mencionados en el presente documento. En particular, dichos fragmentos conservarán parte o toda la funcionalidad del elemento original y, en particular, cualquiera de las funciones mencionadas en el presente documento. Pueden conservar cualquiera de los niveles de funcionalidad mencionados en el presente documento.

5 En algunos casos, un fragmento puede ser al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, todavía más preferentemente al menos un 80 %, incluso más preferentemente al menos un 90 % e incluso más preferentemente al menos un 95 % de la longitud del original. Un fragmento puede ser igual o inferior a dichos porcentajes de longitud del original. En la presente descripción, se pueden emplear variantes de fragmentos funcionales.

10 Las variantes y los fragmentos de secuencias particulares serán funcionales, es decir, conservarán al menos un grado de una determinada función poseída por la secuencia de la que derivan. Por lo tanto, en el caso de los promotores, serán capaces de dar lugar a la transcripción y, en particular, mostrarán al menos una proporción de los niveles de expresión y de la duración mostrados por el promotor inicial. De igual manera, las variantes y los fragmentos pueden conservar una cualquiera o más de las otras funciones mencionadas en el presente documento poseídas, en cierta medida, por la molécula original.

15 *Construcciones*

En un caso preferido, en las construcciones, se utilizan los promotores hCEFI de la presente invención. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende un promotor hCEFI unido operativamente a una secuencia para la expresión, donde el promotor hCEFI comprende:

- 20
- (i) un potenciador CMV humano unido operativamente a un promotor EF1a humano;
 - (ii) un fragmento funcional de (i); o
 - (iii) una variante funcional de (i) o (ii).

25 Las construcciones se pueden usar para dar lugar a la expresión de la secuencia unida operativamente al promotor hCEFI. La secuencia para la expresión puede, en un caso preferido, comprender una secuencia de codificación para la traducción en un polipéptido. En otros casos, la secuencia para la expresión se puede transcribir para dar lugar a una molécula de ARN funcional, o la transcripción se puede procesar para dar lugar a una molécula de ARN funcional.

30 En los casos en los que se hace referencia a la construcción específica de la SEC ID N° 1, se pueden emplear los elementos equivalentes de las construcciones de SEC ID N° 2 y 4 como variantes y fragmentos funcionales de dichas secuencias.

35 En una realización particularmente preferida, la construcción de la invención puede incluir uno o varios intrones. Por lo tanto, por ejemplo, en las construcciones en las que la secuencia que se va a expresar comprende secuencias de codificación, en un caso preferido, puede haber un exón inicial cadena arriba del exón o de los exones que comprenden las secuencias de codificación y, entonces, puede haber un intrón entre ambos.

40 Por lo tanto, la invención proporciona, en un caso, construcciones que comprenden un intrón entre el promotor hCEFI y las secuencias de codificación que se van a expresar. El intrón estará unido operativamente al promotor hCEFI, el exón o los exones iniciales y el exón o los exones que comprenden las secuencias de codificación que se van a expresar. Por lo tanto, el intrón estará unido operativamente a las otras secuencias con las que se va a transcribir, de manera que se corta de la transcripción.

45 Por tanto, la construcción también puede incluir las secuencias donantes yceptoras de cortes y empalmes apropiadas para permitir el corte y empalme de cualquier intrón incluido. Los intrones también pueden estar presentes entremezclados con los exones que comprenden las secuencias de codificación, y luego cortarse y empalmarse para la traducción o, en algunos casos, dichos intrones pueden no estar presentes.

50 Se puede emplear cualquier intrón adecuado y, en particular, se puede emplear, por ejemplo, cualquier intrón que comprenda los niveles de dinucleótidos CpG o que carezca de dichos dinucleótidos como se especifica en el presente documento. Los exones también pueden contener preferentemente dichos niveles de dinucleótidos CpG y, en un caso particularmente preferido, carecer de cualquier dinucleótido CpG.

55 En un caso preferido, una construcción de la descripción comprenderá:

- 60
- (i) el intrón de los nucleótidos 570 a 709 de SEC ID N° 1;
 - (ii) un fragmento funcional de (i); o
 - (iii) una variante funcional de (i) o (ii).

65 En un caso preferido, cualquiera de las construcciones de la invención puede comprender dicho intrón. La variante o el fragmento funcional pueden tener cualquiera de los niveles de identidad de secuencia y longitud especificados en el presente documento o incluso otras características. El intrón será funcional en tanto en cuanto será el corte y empalme de la transcripción resultante producida desde el promotor hCEFI en la construcción. Una variante puede tener, por ejemplo, al menos un 40 %, preferentemente al menos un 50 %, incluso más preferentemente al menos

un 60 % y más preferentemente al menos un 75 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 570 a 709 de la SEC ID N° 1. En algunos casos, el nivel de identidad de secuencia puede ser de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 % e incluso más preferentemente al menos un 95 %. La variante o el fragmento funcional pueden tener una longitud de, por ejemplo, al menos 50, preferentemente al menos 75 e incluso más preferentemente al menos 100 nucleótidos.

En una realización preferida adicional, una construcción de la descripción comprenderá un exón unido operativamente al promotor hCEFI y las secuencias de codificación que se van a expresar con un intrón intercalado que se cortará de la construcción. Uno o más de dichos exones pueden estar presentes y, en particular, dichos exones, por lo general, estarán cadena arriba de la secuencia Kozak, es decir, 5' de la misma.

En un caso preferido, una construcción de la descripción puede comprender un exón que comprende:

- (i) la secuencia de nucleótidos 539 a 569 de SEC ID N° 1;
- (ii) un fragmento funcional de (i); o
- (iii) una variante funcional de (i) o (ii).

Cualquiera de los niveles de características y, en particular, el nivel de identidad de secuencia y la longitud del fragmento especificado en el presente documento, puede definir el exón. Un fragmento o una variante, pueden tener, por ejemplo, al menos 10 nucleótidos, preferentemente al menos 15 e incluso más preferentemente al menos 20 nucleótidos de longitud o pueden tener 30 nucleótidos de longitud. Además, el exón o los exones tienen preferentemente cualquiera de los niveles de dinucleótidos CpG especificados en el presente documento y, en particular, ningún dinucleótido CpG.

En un caso, uno de los exones anteriores también puede incluir el inicio de la secuencia de codificación que se va a expresar. En un caso preferido, hay al menos un exón no codificante y un intrón previo al exón o exones que componen la secuencia de codificación.

En otro caso preferido, puede haber un exón que comprende:

- (i) la secuencia de nucleótidos 710 a 727 de SEC ID N° 1;
- (ii) un fragmento funcional de (i); o
- (iii) una variante funcional de (i) o (ii).

Cualquiera de los niveles de características y, en particular, el nivel de identidad de secuencia y la longitud del fragmento, puede definir el exón. Un fragmento o una variante pueden tener una longitud, por ejemplo, de al menos 5 nucleótidos, preferentemente de al menos 10 e incluso más preferentemente de al menos 12 nucleótidos o pueden tener una longitud de 17 nucleótidos.

En un ejemplo particularmente preferido, una construcción de la descripción puede comprender una combinación de dichos exones y un intrón, en particular, previo al exón o a los exones que comprenden las secuencias de codificación. Así pues, en un caso preferido de la descripción una construcción puede comprender:

- (i) la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 539 a 727 de SEC ID N° 1;
- (ii) un fragmento funcional de (i); o
- (iii) una variante funcional de (i) o (ii).

Los fragmentos y las variantes funcionales pueden tener cualquiera de las características especificadas en el presente documento y, en particular, el nivel de identidad de secuencia y la longitud especificados. Por ejemplo, una variante puede tener al menos un 40 %, preferentemente al menos un 50 %, incluso más preferentemente al menos un 60 % y más preferentemente al menos un 75 % de identidad de secuencia con los nucleótidos 539 a 727 de SEC ID N° 1. En algunos casos, el nivel de identidad de secuencia puede ser al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 % e incluso más preferentemente al menos un 95 %. La variante o el fragmento funcional pueden tener una longitud de, por ejemplo, al menos 75, preferentemente al menos 100 e incluso más preferentemente al menos 150 nucleótidos. Un fragmento o una variante funcional incluirán preferentemente un intrón que está cortado y empalmado apropiadamente. Los cortes y empalmes deben generar una transcripción capaz de expresar el polipéptido deseado. En una realización, una construcción de la descripción comprende dichos exones e intrones y un sitio de restricción de modo que se puede insertar una secuencia seleccionada en la construcción en unión operativa con ellos.

En situaciones en las que la secuencia que se expresa comprende una secuencia de codificación para la expresión, estará preferentemente unida operativamente a los elementos necesarios para la traducción de las secuencias de codificación. Por lo general, una secuencia Kozak y una señal de poliadenilación pueden estar unidas operativamente a la secuencia de codificación. Se puede emplear cualquier secuencia Kozak y de poliadenilación apropiada. En un caso preferido:

- i) la secuencia Kozak puede comprender los nucleótidos 733 a 737 de SEC ID N° 2 o 4, un fragmento funcional de la misma o una variante funcional de cualquiera; y/o
- (ii) la secuencia de poliadenilación puede comprender los nucleótidos 2396 a 2597 de SEC ID N° 4, un fragmento funcional de la misma o una variante funcional de cualquiera.

5 La longitud y el nivel de identidad de secuencia del fragmento y de la variante pueden ser cualquiera de los que se especifican en el presente documento. En el caso de las secuencias de poliadenilación, por ejemplo, el fragmento puede tener una longitud de al menos 50, preferentemente al menos 100 e incluso más preferentemente al menos 150 nucleótidos. El nivel de identidad de secuencia para la secuencia Kozak y/o la secuencia de poliadenilación puede ser de al menos un 50 %, preferentemente de al menos un 60 %, más preferentemente de al menos un 70 %, incluso más preferentemente de al menos un 80 % e incluso más preferentemente de al menos un 90 % o incluso cualquiera de los niveles superiores de identidad de secuencia especificados en el presente documento.

15 La funcionalidad se puede medir mediante cualquier ensayo apropiado incluyendo cualquiera de los mencionados en el presente documento, y el nivel de funcionalidad puede ser cualquiera de los mencionados en el presente documento. En el caso de la secuencia Kozak, por ejemplo, el nivel de traducción puede ser de al menos un 10 %, preferentemente de al menos un 25 %, más preferentemente de al menos un 50 %, incluso más preferentemente de al menos un 75 % e incluso más preferentemente de al menos un 90 % del nivel observado con la secuencia original. En el caso de la secuencia de poliadenilación, el nivel de poliadenilación y/o traducción puede ser, por ejemplo, cualquiera de dichos niveles. También se puede medir la funcionalidad en el nivel de la expresión global y/o la duración de la expresión observada. En algunos casos, la variante o el fragmento puede dar lugar a un nivel de funcionalidad superior al de la secuencia original para cualquiera de los parámetros medidos, tales como, por ejemplo, al menos el doble, triple, cuádruplo o más.

25 En un caso preferido, las construcciones de la invención son construcciones lanzadera, es decir, las construcciones son capaces de replicarse en sistemas bacterianos y usarse luego para la expresión en sistemas eucariotas. Por lo tanto, las construcciones pueden tener, por lo general, un origen de replicación bacteriano que permita el mantenimiento de las construcciones en huéspedes bacterianos y, en particular, en *E. coli*. Se puede emplear cualquier origen de replicación adecuado. En un caso preferido, se puede emplear el origen de replicación R6K. El origen R6K es activado por la proteína B iniciadora específica de R6K codificada por el gen *pir* y, por lo tanto, las construcciones de la invención que comprenden el origen R6K normalmente crecerán en cepas que expresan el gen *pir*. Se puede emplear cualquier cepa adecuada que exprese el gen *pir*. En un caso preferido, las construcciones de la invención que emplean el origen R6K se cultivan en la cepa de *E. coli* GT115, EC100Dpir-116 o DH10Bpir116.

35 En un caso particularmente preferido, el origen de replicación puede comprender la secuencia de nucleótidos 2599 a 2870 de SEC ID N° 4, un fragmento funcional de la misma o una variante funcional de cualquiera. El fragmento y las variantes pueden ser de cualquier longitud y poseer cualquiera de los niveles de identidad de secuencia especificados en el presente documento. El nivel de funcionalidad puede ser cualquiera de los niveles especificados en el presente documento. Por ejemplo, la funcionalidad se puede medir según el rendimiento de la construcción en comparación con la misma construcción, pero con el origen de replicación original en condiciones equivalentes durante el mismo período de tiempo. El rendimiento puede ser, por ejemplo, de al menos un 10 %, al menos un 25 %, preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 75 % e incluso más preferentemente al menos un 90 % en comparación con las construcciones con el origen de replicación original.

45 En un caso preferido adicional, una construcción de la descripción puede comprender un gen para la expresión en bacterias y, en particular, un marcador de selección bacteriano. Se puede emplear cualquier marcador de selección apropiado. En una realización preferida, se emplea un marcador de selección de kanamicina. El empleo del marcador de resistencia a la kanamicina tiene la ventaja de que es particularmente adecuado para su uso en construcciones para la administración a sujetos humanos. En particular, se pueden emplear las secuencias codificantes de la kanamicina de los nucleótidos 2878 a 3693 de SEC ID N° 4, o un fragmento funcional de las mismas o una variante funcional de cualquiera. La secuencia del gen de kanamicina se presenta en sentido contrario a las agujas del reloj en la SEC ID N° 4 y, por lo tanto, el gen se traduce de los nucleótidos 3693 a 2878. En un caso preferido, la unidad del gen de la kanamicina de los nucleótidos 2878 a 3693 puede estar presente en una construcción de la descripción o incluso un fragmento funcional de la misma o una variante funcional de cualquiera.

55 La funcionalidad se puede medir por la capacidad de seleccionar el plásmido en bacterias eficazmente.

El uso del promotor hCEFI implica que las construcciones de la invención normalmente dan lugar a la expresión génica alta y sostenida. Además, también se puede haber diseñado una construcción de la descripción para reducir el contenido de los dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CpG pueden provocar inflamación cuando se administran y, en particular, pueden provocar síntomas gripales, expresión de citoquinas, y la activación y migración de las células inflamatorias. Aunque los dinucleótidos CpG pueden ser de ayuda cuando las construcciones se usan para la vacunación destinada a generar una respuesta inmune, dicha inflamación es indeseable cuando las construcciones se quieren usar para expresar genes con otros fines tales como para el tratamiento de defectos genéticos.

65 Las construcciones de la descripción pueden ser cualquier tipo de construcción. En un caso preferido de la descripción, la construcción puede ser una construcción no viral. En una realización alternativa, la construcción

puede ser una construcción viral. Las construcciones de la presente descripción pueden ser, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, YAC, siendo un ejemplo especialmente preferido los plásmidos. El promotor hCEFI se puede emplear con cualquier estructura del plásmido apropiada. En un caso, las construcciones de la descripción pueden integrarse en el genoma de una célula, en otro, no pueden integrarse. En un ejemplo, se puede proporcionar una construcción de la descripción en forma circular, en otro, se puede proporcionar en forma lineal y puede haber sido linealizada. Una construcción de la descripción puede comprender un sitio de restricción para la linealización.

En un ejemplo, se puede emplear un promotor la descripción en una construcción viral. En un ejemplo particularmente preferido, dicha construcción puede ser una construcción viral que se integre en el genoma de las células. En un caso preferido, dichas construcciones pueden carecer, o el gen que comprende el promotor puede carecer, o tener un número reducido de, dinucleótidos CpG como se describe en el presente documento.

En un caso particularmente preferido, una construcción viral de la descripción que emplea el promotor hCEFI puede ser una construcción retroviral o lentiviral. Las construcciones retrovirales y las construcciones lentivirales se integran en el genoma de las células, pudiéndose reducir o silenciar la expresión de sus genes debido a la metilación de los dinucleótidos CpG. Así pues, en un caso particularmente preferido, el promotor hCEFI de dichas construcciones carecerá de dinucleótidos CpG, preferentemente el gen que comprende el promotor hCEFI y las secuencias que se van a expresar carecerá de dinucleótidos CpG y, en particular, uno o más de cualquiera de los otros elementos mencionados en el presente documento presentes en la construcción carecerán de dinucleótidos CpG. En un caso preferido adicional, no habrá dinucleótidos CpG en el gen que comprende el promotor hCEFI, preferentemente en 100 pb, más preferentemente en 250 pb, todavía más preferentemente en 500 pb e incluso más preferentemente en 1.000 pb cadena arriba del promotor hCEFI y/o cadena abajo del extremo de la unidad transcrita o, en algunos casos, no en al menos dichas distancias. En un caso, puede no haber dinucleótidos CpG en dichas distancias desde el promotor hCEFI ya sea 5' y/o 3', y preferentemente ambos. En un caso, la construcción puede carecer de dinucleótidos CpG por completo o solo tener cualquiera de los números de dinucleótidos CpG especificados en el presente documento.

Por lo general, las construcciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para la administración a cualquiera de los sujetos mencionados en el presente documento y, en particular, a seres humanos. En un caso preferido, las construcciones no incluyen regiones de unión a la matriz (MAR), aunque en otros casos, sí pueden incluirlas. En una realización, las construcciones no emplean un gen de resistencia a la zeocina. En otro caso preferido, una construcción de la invención puede no comprender, por ejemplo, alguno de entre MAR de β -globina, MAR de IFN- β , un gen de resistencia a la zeocina y/o la señal de poliadenilación SV40.

En una realización preferida, la invención proporciona una construcción que comprende un promotor hCEFI, donde se puede clonar una secuencia de codificación en el vector a través de un sitio de enzima de restricción. En particular, se proporciona una construcción de este tipo que comprende un sitio de restricción en el que se puede insertar una secuencia de codificación en unión operativa con el promotor hCEFI. El sitio de restricción, puede ser, por ejemplo, un sitio de enzima de restricción para cualquiera de las enzimas de restricción mencionadas en el presente documento. En un caso, el sitio de restricción es un sitio de restricción NheI o Apal.

El sitio de restricción puede ser único para la construcción. Una construcción de este tipo puede comprender cualquiera de los otros elementos mencionados en el presente documento. En un caso particularmente preferido, una construcción de este tipo comprende un exón o exones iniciales y un intrón o intrones, de manera que se puede insertar simplemente una secuencia de codificación en unión operativa con ellos.

En un caso particularmente preferido, se proporciona una construcción que comprende:

- (i) la secuencia de SEC ID N° 1; o
- (ii) una construcción con al menos un 70 % de identidad de secuencia con (i) y que comprende un promotor hCEFI de la invención.

Se puede proporcionar una construcción con cualquiera de los niveles de identidad de secuencia especificados en el presente documento con la SEC ID N° 1. La invención también comprende un método que comprende la inserción de una secuencia de codificación en dicha construcción, de modo que esté unida operativamente al promotor hCEFI. La invención también proporciona una construcción de este tipo con la secuencia que se va a expresar clonada en la misma en unión operativa con el promotor hCEFI incluyendo cualquiera de las secuencias mencionadas en el presente documento.

En un caso preferido adicional, la presente descripción proporciona una construcción, en la que la secuencia que se va a expresar unida operativamente al promotor hCEFI codifica un polipéptido CFTR, donde la construcción comprende:

- (i) la secuencia de SEC ID N° 2, o una variante de SEC ID N° 2 en la que el nucleótido 2595 es C, el nucleótido 3234 es T y el nucleótido 3236 es C; o

(ii) una construcción con al menos un 70 % de identidad de secuencia con (i) y que comprende un promotor hCEFI como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Se proporciona una construcción con cualquiera de los niveles de identidad de secuencia especificados en el presente documento con la SEC ID No: 2 que codifica un gen CFTR funcional capaz de corregir totalmente, o al menos parcialmente, la expresión de CFTR unido operativamente a un promotor hCEFI de la descripción. En un caso preferido, la variante de construcción comprenderá la secuencia de codificación de CFTR de SEC ID N° 2 y, por lo tanto, expresará la misma proteína. Se pueden emplear fragmentos y variantes funcionales de la secuencia de codificación específica de CFTR. Las variantes y los fragmentos tendrán preferentemente una optimización de los codones.

En un caso preferido adicional, la presente descripción proporciona una construcción, en la que la secuencia que se va a expresar operativamente unida al promotor hCEFI codifica un polipéptido de la luciferasa, donde la construcción comprende:

(i) la secuencia de SEC ID N° 4; o

(ii) una construcción con al menos un 70 % de identidad de secuencia con (i) y que comprende un promotor hCEFI como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Una variante de construcción puede tener cualquiera de los niveles de identidad de secuencia especificados en el presente documento con la SEC ID No: 4 y, en particular, puede tener la misma secuencia de codificación de la luciferasa que SEC ID N° 4.

En un ejemplo más, la secuencia de codificación de la luciferasa puede estar reemplazada por secuencias que codifican cualquier gen marcador. Así pues, en una realización, una construcción de la invención puede comprender un marcador o un gen indicador en unión operativa con el promotor hCEFI. Los ejemplos de genes indicadores cuyas secuencias de codificación se pueden usar incluyen cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa y la proteína verde fluorescente. También se pueden emplear fragmentos funcionales y variantes funcionales.

En algunos casos, una construcción de la invención puede comprender secuencias que codifiquen una secuencia que permita la purificación del polipéptido expresado tal como un marcador de histidina o una secuencia c-myc u otra secuencia de detección de anticuerpos. Las construcciones también pueden comprender las secuencias de codificación para las señales de secreción de una célula. En algunos casos, la construcción de la invención puede comprender dichas secuencias, pudiéndose entonces clonar una secuencia de codificación en la construcción según proceda, en unión operativa con dichas secuencias.

En otro caso preferido, la secuencia de codificación unida operativamente al promotor hCEFI puede haber sido optimizada en cuanto a los codones para la expresión en el sujeto apropiado y, en particular, para la expresión en seres humanos. Se proporcionan las secuencias de codificación específicas de la luciferasa y CFTR proporcionadas en el presente documento que han sido optimizadas en codones, así como los fragmentos funcionales y las variantes funcionales de los mismos, con cualquiera de los niveles de identidad de secuencia, longitud y otras características especificadas en el presente documento.

Las secuencias de codificación clonadas en las construcciones de la invención pueden ser de cualquier tamaño apropiado para la construcción en cuestión. Así pues, por ejemplo, un plásmido puede comprender una secuencia de codificación de 30 pb a 25 kb, aunque en algunos casos, se pueden emplear secuencias de codificación menores o mayores. En algunos casos, las secuencias de codificación pueden ser de 250 a 30 kb, preferentemente de 300 pb a 25 kb, más preferentemente de 500 pb a 20 kb, todavía más preferentemente de 500 pb a 15 kb e incluso más preferentemente de 1.000 pb a 10 kb. El intervalo puede comprender cualquier combinación de esos tamaños y la secuencia que se expresa normalmente dictará la longitud de la secuencia de codificación. Las construcciones tales como los cósmidos y YAC pueden comprender insertos mayores. Se seleccionará una construcción apropiada para la secuencia de codificación que se vaya a expresar.

Una construcción de la invención puede estar sustancialmente exenta de, o asociada con, células o con material celular. Puede estar en forma sustancialmente aislada o puede estar en forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 %, 98 %, 99 % o más del polinucleótido o masa seca de la preparación.

Dinucleótidos CpG

En una realización especialmente preferida de la invención, uno o más de los elementos, y preferentemente toda la construcción, carecerán de dinucleótidos CpG. Dichas construcciones son particularmente útiles cuando las construcciones no están destinadas a generar una respuesta inmune contra un antígeno. La presencia de dinucleótidos CpG puede generar síntomas gripales e inflamación, particularmente cuando se administran en las vías respiratorias. La eliminación de los dinucleótidos CpG puede ayudar a suprimir dichos efectos.

La respuesta inflamatoria observada tras la administración de complejo de plásmido/liposoma surge en parte del reconocimiento de los dinucleótidos CpG no metilados presentes en el ADNp derivado de bacterias. El ADN de mamífero difiere del ADN bacteriano en que la frecuencia de los dinucleótidos CpG está muy inhibida en comparación con la del ADN bacteriano, y la mayoría de las secuencias CpG de mamíferos están metiladas. El ADN de plásmido derivado de bacterias activa varios tipos de células inmunes/inflamatorias, incluyendo linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y linfocitos citolíticos naturales. Como se muestra en los ejemplos de la presente solicitud, la presencia de un solo dinucleótido CpG puede conducir a una respuesta inflamatoria.

Se podrían emplear varias estrategias para reducir las propiedades inmunoestimulantes de las construcciones. Un enfoque podría ser el de metilar enzimáticamente todas las secuencias CpG. Aunque la metilación *in vitro* de todos los dinucleótidos CpG de un ADNp dado disminuye significativamente las consecuencias inflamatorias de la administración de plásmido/liposoma en el pulmón, también inhibe gravemente la expresión del transgén. Así pues, aunque la metilación se puede emplear, en un caso preferido no se emplea.

Un enfoque alternativo que se puede emplear en la presente invención es el de eliminar o reducir la frecuencia de las secuencias CpG en las construcciones de la invención. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante la eliminación de regiones no esenciales de la construcción (por ejemplo, secuencias que flanquean el origen de replicación) y también, por ejemplo, mediante el rediseño de los elementos reguladores y fases abiertas de lectura para reducir al mínimo las secuencias CpG.

Así pues, por ejemplo, los elementos y las construcciones empleados en la descripción pueden haber sido modificados para eliminar al menos uno, preferentemente al menos cinco, incluso más preferentemente al menos diez, todavía más preferentemente al menos 20 y en algunos casos al menos 30 dinucleótidos CpG de la secuencia de origen natural.

La presencia de un contenido mínimo o nulo de dinucleótidos CpG ayuda a minimizar las respuestas inflamatorias inducidas por el vector. Por lo tanto, el promotor u otro elemento y, preferentemente, la construcción en su conjunto, puede comprender, por ejemplo, menos de 15, preferentemente menos de 10, más preferentemente menos de 5, incluso más preferentemente 4, 3, 2, 1 o cero dinucleótidos CpG. En una realización especialmente preferida, el promotor no comprenderá dinucleótidos CpG para eliminar las respuestas inmunes inducidas por los dinucleótidos CpG.

En una realización preferida, las construcciones de la descripción se habrán modificado para eliminar al menos un nucleótido CpG del promotor hCEFI, pudiendo estar también modificados de este modo, si están presentes, uno o varios de entre la secuencia unida operativamente para la expresión, la secuencia Kozak, la señal de poliadenilación, el origen de replicación y/o el marcador de selección. En algunos casos, se pueden haber eliminado al menos dos, preferentemente al menos cinco, más preferentemente al menos diez, más preferentemente al menos quince e incluso más preferentemente al menos veinte, más preferentemente al menos 50 e incluso más preferentemente al menos 100 dinucleótidos CpG e incluso más preferentemente todos los dinucleótidos CpG de un determinado elemento o de la construcción en su conjunto. Se puede usar, por ejemplo, la mutagénesis dirigida y la síntesis de oligonucleótidos específicos de secuencia para eliminar los dinucleótidos CpG, así como cualquier técnica de biología molecular apropiada.

La invención proporciona la secuencia de codificación de CFTR de los nucleótidos 738 a 5180 de la SEC ID N° 2, un fragmento funcional de la misma o una de sus variantes funcionales y, en particular, cuando dichas secuencias no tienen dinucleótidos CpG. El nivel de identidad de secuencia o la longitud de la variante o del fragmento puede ser cualquiera de los especificados en el presente documento. Más concretamente, la invención proporciona una variante de la región de codificación de CFTR de los nucleótidos 738 a 5180 de SEC ID N° 2, en la que el nucleótido de la posición 2595 es una C en lugar de una A, cambiando así el codón de AAT, que codifica la asparagina, a CAT, que codifica la histidina en la posición del amino ácido 620 del polipéptido correspondiente. La región que codifica CFTR de SEC ID N° 2 se puede modificar además o alternativamente de manera que el nucleótido de la posición 3234 sea una T en lugar de una C, y el nucleótido de la posición 3236 sea una C en lugar de una G, cambiando así el codón de CTG, que codifica la leucina, a TTC, que codifica la fenilalanina en la posición del amino ácido 833 del polipéptido correspondiente.

La invención también proporciona fragmentos funcionales o variantes funcionales de una secuencia de codificación de CFTR que incluye uno de los cambios de codón o ambos anteriormente mencionados.

Se pretende que toda referencia realizada en el presente documento a una secuencia que codifica el CFTR incluya la secuencia de los nucleótidos 738 a 5180 de SEC ID N° 2, y una variante de la misma con cualquiera de los dos cambios de codón anteriormente mencionados. Del mismo modo, la invención permite construcciones de plásmidos que incluyen una secuencia que codifica CFTR con cualquiera de los cambios de codón o ambos. Preferentemente, se realizan ambos cambios de codón.

Se pueden realizar cambios en la secuencia del gen CFTR, o incluso en cualquier parte de la construcción, usando cualquier técnica adecuada, incluyendo el uso de PCR para producir fragmentos de recambio o sintetizar fragmentos de recambio y la clonación de estos fragmentos en la construcción. El efecto de la presencia de dinucleótidos CpG se puede estudiar usando cualquier ensayo apropiado. En particular, una secuencia objeto de ensayo se puede administrar a un animal no humano y, preferentemente, medirse la inflamación. En un caso preferido, se emplean ratones y, en particular, la administración se realiza en las vías respiratorias. Se pueden medir, por ejemplo, parámetros tales como el recuento de células inflamatorias, en particular, el recuento de neutrófilos y los niveles de citocinas tales como TNF- α , IFN- γ e IL-12.

10 *Secuencias que se expresan y condiciones*

Las construcciones de la invención pueden comprender cualquier secuencia apropiada para la expresión unida operativamente al promotor hCEFI. En un caso particularmente preferido, la secuencia que se expresa puede comprender una secuencia de codificación y, por lo tanto, codificar un polipéptido. En otros, las secuencias para la expresión se pueden transcribir para dar lugar a moléculas de ARN que bien son funcionales por sí mismas o se procesan para dar lugar a moléculas de ARN funcionales. Por ejemplo, las construcciones de la invención se pueden usar para expresar ARN antisentido, ARNip y ribozimas, y por lo tanto, se pueden usar para modular la expresión de cualquiera de los genes mencionados en el presente documento y, en particular, para disminuir o suprimir la expresión.

En caso de que la secuencia unida operativamente al promotor hCEFI comprenda una secuencia de codificación que se traduce dando lugar a un polipéptido, se puede expresar cualquier polipéptido adecuado. El polipéptido expresado puede ser, por ejemplo, un polipéptido terapéutico, una enzima, una proteína estructural, un canal de membrana o un componente del mismo, un inhibidor (en particular, un inhibidor de la enzima), una molécula de señalización (tal como una citoquina) o cualquier polipéptido que se desee expresar. Para cualquiera de los polipéptidos mencionados en el presente documento, también se pueden expresar fragmentos funcionales y variantes funcionales.

En una realización, el polipéptido expresado puede ser un polipéptido terapéutico. En particular, el polipéptido puede compensar un defecto genético, lo que significa que un determinado producto génico está ausente o es defectuoso en un sujeto. La afección puede ser aquella en la que un determinado polipéptido falta o es defectuoso en todas las células o, como alternativa, en particular, solo en determinados tipos de células, tejidos u órganos. En algunos casos, la expresión del polipéptido se puede necesitar en el pulmón, el hígado, el músculo, el cerebro y/o los ojos. Un tejido muscular preferido es el corazón. Por lo tanto, las construcciones de la invención se pueden usar para expresar las secuencias seleccionadas en dichos tejidos. En un caso particularmente preferido, el tejido es pulmón o hígado y, en particular, pulmón.

En una realización preferida de la invención, el tejido en el que se puede desear para conseguir la expresión de las secuencias unidas al promotor hCEFI puede ser el pulmón. En un caso particularmente preferido, la afección por tratar es un trastorno de las vías respiratorias o una enfermedad que afecta al pulmón. En un caso preferido, la secuencia expresada y, en particular, el polipéptido, puede ser uno destinado a tratar uno o más de los trastornos de fibrosis quística, asma, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), bronquitis y neumonía. En un caso especialmente preferido, se puede tratar la fibrosis quística.

En una realización, la construcción puede expresar una secuencia para el tratamiento de la enfermedad pulmonar bronquial aguda o crónica, tal como la neumonía infecciosa, bronquitis o traqueobronquitis, bronquiectasias, tuberculosis y/o infecciones por hongos. El sujeto puede tener una infección del tracto respiratorio. El sujeto puede tener sinusitis, congestión de los senos nasales o infecciones virales que infecten el sistema respiratorio, como un resfriado o una gripe. Las construcciones pueden expresar secuencias para el tratamiento de dichas afecciones.

En un caso especialmente preferido, la secuencia de codificación codifica un polipéptido para el tratamiento de la fibrosis quística y, en particular, codifica un regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), un fragmento funcional del mismo o una variante funcional de cualquiera. El polipéptido codificado puede ser, por ejemplo, α -1-antitripsina y, por consiguiente, la construcción se puede usar para tratar el enfisema. Para las afecciones tales como EPOC y SDRA, en un caso preferido, los polipéptidos codificados pueden ser proteínas de choque térmico (HSP-70) o citoquinas antiinflamatorias, y en particular, interleucinas y, preferentemente, IL-10.

Ya se han propuesto diversos agentes terapéuticos para el tratamiento del asma y de otras enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias (véase, por ejemplo, Demoly *et al.*, *Gene Therapy* (1997) 4, 507-516) y también se podrían expresar ventajosamente en las vías respiratorias por medio de una construcción de expresión de acuerdo con la invención. A modo de ejemplo de genes particulares que se pueden expresar a partir de las construcciones de la invención, se enumeran los siguientes: CD40 soluble, IL-1R, IL-4R, receptor de TNF, IL-10, IL-12, interferón γ , TGF β e inhibidores polipeptídicos del factor de transcripción nuclear κ B humano. Los ejemplos de secuencias para ser expresadas de codificación incluyen:

- Nº de acceso del GenBank M27492 (fragmento soluble del producto génico de IL-R humano) y Sims *et al.*, "Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. (1989) 86, 8946-8950;
- Nº de acceso del GenBank X52425 (fragmento soluble del producto génico de IL4-R humano; Idzerda *et al.*, "Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily", *J. Exp. Med.* (1990) 171, 861-873;
- 5 - Nº de acceso del GenBank U53483 (fragmento soluble del producto génico del receptor de TNF humano; Santee *et al.*, "Human tumour necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization", *J. Biol. Chem.* (1996) 271, 21151-21159;
- Nº de acceso del GenBank X13274 (producto génico del IFN humano); Gray *et al.*, "Expression of human immune interferon 30 cDNA in *E. coli* and monkey cells", *Nature* (1982) 295, 503-504;
- 10 - Nº de acceso del GenBank M57627 (producto génico de IL-10 humana); Vieira *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. (1991) 88, 1172-1176;
- Nº de acceso del GenBank AF180562 y AF180563 (cadenas de IL-12; productos génicos de p35 y p40);
- 15 - Nº de acceso del GenBank X02812 (producto génico de TGF β humano); Derynck *et al.*, "Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells", *Nature* (1985) 316, 701-705.

Las secuencias anteriores se pueden modificar para eliminar o reducir la aparición de dinucleótidos CpG como cualquiera de las secuencias de codificación descritas en el presente documento. Se pueden emplear fragmentos y variantes funcionales.

En una realización preferida adicional, una construcción de la descripción puede expresar una secuencia para el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de cánceres particulares incluyen los cánceres de pulmón, próstata, mama, colon, ovario, testículos, intestino, melanoma, un linfoma y una leucemia. En un caso particularmente preferido, el cáncer es cáncer de pulmón y, en particular, cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Para usarlas para tratar el cáncer, las construcciones de la descripción, en un caso, pueden codificar genes supresores de tumores tales como p53 y Rb y, en particular, Rb. Los ejemplos de genes supresores de tumores que se pueden expresar, y las afecciones que pueden tratar incluyen RB1 (gen de susceptibilidad al retinoblastoma), WT1 (gen del tumor de Wilms), NF1 (gen de neurofibromatosis de tipo 1), NF2 (gen de neurofibromatosis de tipo 2), DCC (cáncer colorrectal) y BRCA1 y BRCA2 (cáncer de mama).

Las construcciones para su uso de acuerdo con la descripción para tratar el cáncer de pulmón se pueden basar en hCEFI para dirigir la expresión en los pulmones de diversos agentes terapéuticos propuestos anteriormente para el tratamiento de cánceres, incluyendo, por ejemplo, preferentemente, enzimas de conversión de profármacos. Por enzima de conversión de profármacos, se entenderá un producto génico que activa un compuesto con poca o ninguna citotoxicidad en un producto tóxico. Ya se han propuesto varias estrategias de activación de profármacos para el tratamiento del cáncer (véase, por ejemplo, la solicitud internacional publicada Nº WO 95/07994 y EP-B 0 702 084 de Chiron Corp.) y se pueden adoptar proporcionando un vector de acuerdo con la presente descripción junto con el profármaco apropiado y, en particular, en el pulmón. Así pues, por ejemplo, un vector para su uso en la terapia del cáncer de pulmón puede estar construido preferentemente de manera que un mismo hCEFI dirija la expresión de una timidina quinasa viral, por ejemplo, la timidina quinasa del virus Herpes simplex. Para la terapia de activación de profármacos, dicha enzima se emplea junto con una purina o un análogo de pirimidina, por ejemplo, ganciclovir, que es fosforilado por la timidina quinasa viral en una forma trifosfato tóxica. Los ejemplos de otras enzimas de conversión de profármacos que se pueden expresar ventajosamente a partir de un promotor hCEFI en los pulmones para la terapia de activación de profármacos del cáncer y, en particular, del cáncer de pulmón incluyen:

- citosina desaminasa, que convierte el profármaco 5-fluorocitosina en el compuesto tóxico 5-fluorouracilo (Mullen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. (1992) 89, 33; véase también "Efficiency of adenovirus-mediated CD/5-FC and HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapies concomitant with p53 gene therapy", Xie *et al.*, *Clinical-Cancer Res.* (1999) 5, 4224-4232);
- carboxipeptidasa G2 que escindirá el ácido glutámico del ácido *para-N*-bis(2-cloroetil)aminobenzoil-glutámico creando así una mostaza de ácido benzoico tóxica;
- 55 - la penicilina-V amidasa que convertirá derivados de fenoxiacetabida de doxorubicina y melfalán en compuestos tóxicos (Vrudhula *et al.*, *J. Med. Chem.* (1993) 36, 919-923; Kern *et al.*, *Canc. Immun. Immunother.* (1990) 31, 202-206);
- factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas y timidina fosforilasa (PD-ECGF/TP) que convierte el profármaco 5'-desoxi-5-fluorouracilo (Furtulon) en 5'-fluorouracilo y 5'-desoxi-D-ribose-1-fosfato (véase, por ejemplo, "Thymidine phosphorylase activity and prodrug effects in a three-dimensional model of angiogenesis; implications for the treatment of ovarian cancer", Stevens *et al.*, *Am. J. Pathol.* (1998) 153, 1573-1578); y
- 60 - nitrorreductasa de *E. coli*, que se ha utilizado con el profármaco CB1954 ("The nitroreductase/CB1954 combination in Epstein-Barr virus-positive B-cell lines: induction of bystander killing in vitro and in vivo", Westphal *et al.*, *Cancer- Gene-Therapy* (enero de 2000) 7, 97-106).

65

En otras realizaciones preferidas, las construcciones para el tratamiento del cáncer pueden codificar productos génicos citotóxicos y/o profármacos que incluyen combinaciones de HSVtk/GCV y CD/5-FC o incluso se puede expresar un miembro de cada combinación a partir de una construcción de la descripción. Las metástasis se podrían tratar, por ejemplo, con construcciones que codifican IL-12, FAS para modular la expresión génica del hospedador o combinaciones de producto génico citotóxico/profármaco. Una vez más, en algunos casos, se puede administrar solo un miembro de la combinación en combinación con una construcción de la descripción que exprese el otro miembro de la combinación. En algunos casos, una construcción de la descripción puede expresar una ribozima, ARNip o un ARN anti-sentido para reprimir la expresión génica en las células tumorales y, por lo tanto, tratar el cáncer. En un caso preferido, se puede usar cualquiera de dichos elementos para tratar el cáncer en el tratamiento del cáncer de pulmón.

En un aspecto adicional de la descripción, la construcción puede expresar un polipéptido para tratar una afección muscular y, en particular, una distrofia muscular. Por lo tanto, las construcciones de la descripción se pueden administrar de manera que expresen los genes distrofina, mini-distrofina o utrofina y, en particular, en el músculo esquelético para tratar dichas afecciones. Se pueden emplear fragmentos y variantes funcionales.

Las construcciones de la descripción también se pueden usar para expresar factores angiogénicos. Los factores angiogénicos que se pueden expresar incluyen angiogenina, angiopoyetina-1, Del-1, factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo folistatina ácida (aFGF) y básica (bFGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF), interleucina-8 (IL-8), leptina, midquina, factor de crecimiento placentario, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento-BB derivado de plaquetas (PDGF-BB), pleyotrofina (PTN), progranulina, proliferina, factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y factor de permeabilidad vascular (VPF). Los factores angiogénicos mencionados en particular incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Los factores angiogénicos se pueden usar para tratar cualquier afección en la que se desee estimular el crecimiento de los vasos sanguíneos. Los ejemplos de dichas afecciones incluyen enfermedad coronaria, apoplejía y cicatrización retardada.

Las construcciones de la descripción también se pueden usar para expresar factores antiangiogénicos. Los ejemplos de factores antiangiogénicos incluyen angioarrestina, angiostatina (fragmento de plasminógeno), antitrombina III antiangiogénica, inhibidor derivado de cartilago (CDI), fragmento del complemento CD59, endostatina (fragmento de colágeno XVIII), fragmento de fibronectina, Gro- β , heparinasas, gonadotropina coriónica humana (hCG), interferón $\alpha/\beta/\gamma$, proteína inducible del interferón (IP-10), interleucina-12, Kringle 5 (fragmento de plasminógeno), inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP), inhibidor de la ribonucleasa placentaria, factor plaquetario-4 inhibidor del activador del plasminógeno (PF4), fragmento de 16 kD de prolactina, proteína relacionada con la proliferina (PRP) retinoides, tetrahidrocortisol-S, trombospondina-1 (TSP-1), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), vasculostatina y vasostatina (fragmento de calreticulina).

Las construcciones de la invención se pueden usar en el tratamiento de la angiogénesis excesiva. Por lo tanto, los ejemplos de afecciones que se pueden tratar con dichas construcciones incluyen cáncer, ceguera diabética, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide y psoriasis.

En otro caso particularmente preferido de la descripción, las construcciones se pueden usar para expresar secuencias en el epitelio y, en particular, en el epitelio ocular. Así pues, las construcciones de la descripción se pueden usar para tratar la degeneración macular (AMD) y, por consiguiente, la descripción proporciona construcciones que expresan el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) para alterar el crecimiento celular y también construcciones que expresan el inhibidor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

En un caso, la construcción puede expresar el factor VIIa, factor VIII, factor IX, glucocerebrosidasa, α -galactosidasa, α -glucosidasa ácida, α -n-acetilgalactosaminidasa, esfingomielinasa ácida, α -iduronidasa, distrofina o α -1-antitripsina.

En un caso, las secuencias de codificación expresadas a través de hCEFI pueden codificar un antígeno, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de cualquiera. El antígeno puede ser en particular un antígeno de patógeno viral, bacteriano, parasitario o fúngico, o un antígeno tumoral. El antígeno puede ser un antígeno alérgico. En un caso preferido, el antígeno es un antígeno viral, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de cualquiera.

En realizaciones en las que se pretende generar una respuesta inmune contra un antígeno, en un caso, una construcción, o su elemento o elementos, no se pueden haber modificado para eliminar los dinucleótidos CpG. En un caso alternativo, sí se pueden haber modificado El promotor hCEFI da lugar a una expresión potente y sostenida y, por lo tanto, será útil en la generación de una respuesta inmune.

Así pues, la presente descripción también proporciona una vacuna que comprende una construcción de la descripción que codifica un antígeno y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La descripción también proporciona un método de vacunación o inmunización que comprende la administración de una construcción de la descripción. Dichos métodos generarán preferentemente una respuesta inmune protectora contra el patógeno contra el que el antígeno está diseñado para dar una respuesta inmune. En el caso de los alérgenos y autoantígenos, la administración puede resultar intencionadamente en tolerancia.

Se pueden usar inmunizaciones o vacunaciones posteriores para estimular la respuesta inmune observada. Se pueden expresar fragmentos inmunogénicos y variantes inmunogénicas de antígenos específicos.

En una realización preferida, una construcción de la descripción puede codificar un polipéptido para tratar o prevenir un cáncer. En una realización particularmente preferida, una construcción de la descripción puede codificar un antígeno tumoral, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de cualquiera. Los ejemplos de antígenos asociados a tumores incluyen, pero sin limitación, antígenos del cáncer de testículos tales como los miembros de la familia MAGE (MAGE 1, 2, 3, etc.), NY-ESO-1 y SSX-2, antígenos de diferenciación tales como tirosinasa, gp100, PSA, Her-2 y CEA, auto-antígenos mutados y antígenos tumorales virales tales como E6 y/o E7 de los tipos de VPH oncogénicos. Otros ejemplos de determinados antígenos tumorales incluyen los antígenos MART-1, Melan-A, p97, β -HCG, GalNAc, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-4, MAGE-12, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC18, CEA, DDC, P1A, EpCam, antígeno de melanoma gp75, Hker 8, antígeno de melanoma de alto peso molecular, K19, Tyr1, Tyr2, miembros de la familia de genes pMel 17, c-Met, PSM (antígeno de mucina de próstata), PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), proteína secretora de la próstata, α -fetoproteína, CA125, CA19.9, TAG-72, BRCA-1 y BRCA-2.

Los ejemplos de cánceres particulares de los que se puede derivar el antígeno incluyen los de los cánceres de pulmón, próstata, mama, colon, ovario, testículos, intestino, melanoma, un linfoma y una leucemia. Las construcciones de la descripción también se pueden usar para tratar o prevenir dichos cánceres.

La construcción puede codificar un antígeno para el tratamiento o la prevención de una serie de afecciones incluyendo, pero sin limitación, cáncer, alergias, toxicidad e infección por un patógeno tal como, pero sin limitación, un hongo, un virus, incluyendo virus del papiloma humano (HPV), VIH, HSV2/HSV1, virus de la gripe (tipos A, B y C), virus de la polio, virus RSV, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, grupo de virus Norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus paragripales, virus de las paperas, virus de la varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus de la rubéola, virus del linfoma de tipo I de linfocitos T humanos (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis D, virus de la viruela, Marburg y Ébola; una bacteria incluyendo *M. tuberculosis*, *Chlamydia*, *N. gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio Cholera*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Franciscella tulorensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Hemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Complybacteriosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Donovanosis* y *Actinomycosis*; hongos patógenos incluyendo candidiasis y aspergilosis; parásitos patógenos incluyendo tenias, trematodos, gusanos redondos, *Amibiasis*, *Giardiasis*, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, tricomoniasis y triquinosis.

El ácido nucleico también se puede usar para proporcionar una respuesta inmune adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias, tales como la fiebre aftosa, Coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, virus de la diarrea viral bovina (VDVB), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica*.

En un ejemplo, una construcción de ácido nucleico de la descripción puede codificar un antígeno de un miembro de *adenoviridae* (incluyendo, por ejemplo, un adenovirus humano), *herpesviridae* (incluyendo, por ejemplo, HSV-1, HSV-2, EBV, CMV y VZV), *papovaviridae* (incluyendo, por ejemplo, HPV), *poxyviridae* (incluyendo, por ejemplo, viruela y vaccinia), *parvoviridae* (incluyendo, por ejemplo, parvovirus B19), *reoviridae* (incluyendo, por ejemplo, un rotavirus), *coronaviridae* (incluyendo, por ejemplo, SRAS), *flaviviridae* (incluyendo, por ejemplo, fiebre amarilla, virus del Nilo Occidental, dengue, hepatitis C y encefalitis transmitida por garrapatas), *picornaviridae* (incluyendo poliomielitis, rinovirus y hepatitis A), *togaviridae* (incluyendo, por ejemplo, virus de la rubéola), *filoviridae* (incluyendo, por ejemplo, Marburg y Ébola), *Paramyxoviridae* (incluyendo, por ejemplo, un virus paragripal, virus sincitial respiratorio, paperas y sarampión), *rhabdoviridae* (incluyendo, por ejemplo, virus de la rabia), *bunyaviridae* (incluyendo, por ejemplo, el virus Hanta), *orthomyxoviridae* (incluyendo, por ejemplo, los virus de la gripe A, B y C), *retroviridae* (incluyendo, por ejemplo, VIH y HTLV) y *hepadnaviridae* (incluyendo, por ejemplo, hepatitis B). En un caso preferido adicional, el antígeno puede ser de un patógeno responsable de una enfermedad veterinaria y, en particular, puede ser de un patógeno viral, incluyendo, por ejemplo, un reovirus (tal como la peste equina africana o el virus de la lengua azul) y los virus del herpes (incluyendo el herpes equino). El antígeno puede ser uno del virus de la fiebre aftosa. En un caso preferido adicional, el antígeno puede ser de un virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del dengue, SARS, virus del Nilo Occidental y virus Hanta.

5 El antígeno puede ser un antígeno fúngico, tal como un antígeno de *Candida* o *Aspergillus*. En particular, puede ser de *Candida albicans* o *Aspergillus fumigatus*. El antígeno puede ser de *Sporothrix* (por ejemplo, de *Sporothrix schenckii*), *Histoplasma* (por ejemplo, de *Histoplasma capsulatum*) *Cryptococcus* (por ejemplo, de *Cryptococcus neoformans*) o *Pneumocystis* (por ejemplo, de *Pneumocystis carinii*). El antígeno puede ser de un patógeno parasitario y puede ser, en particular, de tenias, trematodos, gusanos redondos, *Amibiasis*, *Giardiasis*, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, tricomoniasis y triquinosis.

10 En algunos casos, el antígeno puede ser un antígeno de un príon. En particular, el antígeno puede ser uno del agente causante del kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), tembladera, encefalopatía transmisible del visón y caquexias crónicas, o de un príon asociado a una encefalopatía esponjiforme, en particular, a BSE. El antígeno puede ser del príon responsable del insomnio familiar fatal.

15 En algunos casos, el antígeno puede ser de parásitos patógenos que incluyen, por ejemplo, uno de los géneros *Plasmodium*, *Chtamydia*, *Tripanosoma*, *Giardia*, *Boophilus*, *Babesia*, *Entamoeba*, *Eimeria*, *Leishmania*, *Schistosoma*, *Brugia*, *Fasciola*, *Dirofilaria*, *Wuchereria* y *Onchocerca*. Los ejemplos de antígenos preferidos de parásitos patógenos que se van a expresar como el antígeno heterólogo incluyen los antígenos del circumsporozoito de la especie *Plasmodium*, tales como el antígeno de circumsporozoito de *P. bergerii* o el antígeno de circumsporozoito de *P. falciparum*; el antígeno de superficie de merozoitos de la especie *Plasmodium*; la lectina específica de la galactosa de *Entamoeba histolytica*; gp63 de la especie *Leishmania*; paramiosina de *Brugia malayi*; la triosa-fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*, la proteína de tipo globina secretada de *Trichostrongylus colubriformis*; las glutatión-S-transferasas de *Fasciola hepatica*, *Schistosoma bovis* y *S. japonicum*; y KLH de *Schistosoma bovis* y *S. japonicum*.

25 El antígeno puede ser un autoantígeno. En particular, el antígeno puede ser un antígeno asociado con una enfermedad autoinmune. Los autoantígenos incluyen los asociados con enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 dependiente de la insulina, lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide. El antígeno puede ser uno asociado con el síndrome de Sjorgrens, miotis, esclerodermia o síndrome de Raynaud. Otros ejemplos de trastornos autoinmunes con los que el antígeno puede estar asociado incluyen colitis ulcerosa, enfermedad de Crohns, trastorno inflamatorio del intestino, enfermedad hepática autoinmune o tiroiditis autoinmune. Los ejemplos de autoantígenos específicos incluyen la insulina, glutamato descarboxilasa 65 (GAD65), proteína de choque térmico 60 (Hsp60), proteína básica de la mielina (MBP), proteína del oligodendrocito de la mielina (MOG), proteína proteolipídica (PLP) y colágeno de tipo II. En los casos en que el antígeno es un autoantígeno, el antígeno se administrará, por lo general, para promover la tolerancia al autoantígeno. Aunque en algunos casos, se pueden producir modelos de las enfermedades usando construcciones de la descripción para ser
35 producir una respuesta inmune.

40 En algunos casos, el antígeno puede ser un alérgeno. El antígeno alergénico puede ser cualquier antígeno adecuado de un antígeno. Por ejemplo, el alérgeno puede de *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Artemisia vulgaris*, *Helianthus annuus*, *Mercurialis annua*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*, *Parietaria judaica*, *Parietaria officinalis*, *Cynodon dactylon*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Holcus lanatus*, *Lolium perenne*, *Phalaris aquatica*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis* o *Sorghum halepense*. El antígeno alergénico puede ser de un árbol, tal como, por ejemplo, de *Phoenix dactylifera*, *Betula verrucosa*, *Carpinus betulus*, *Castanea sativa*, *Corylus avellana*, *Quercus alba*, *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Olea europea*, *Syringa vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Cryptomeria japonica*, *Cupressus arizonica*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus virginiana* o *Juniperus sabinoides*. En algunos casos, el antígeno puede ser de un antígeno de un ácaro tal como, por ejemplo, *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides microceras*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Euroglyphus maynei*, *Glyciphagus domesticus*, *Lepidoglyphus destructor* o *Tyrophagus putrescentiae*.

50 El antígeno alergénico puede ser de un animal tal como, por ejemplo, de un animal doméstico o agrícola. Los ejemplos de alérgenos de animales incluyen los de ganado vacuno, caballos, perros, gatos y roedores (por ejemplo, de rata, ratón, hámster o cobaya). En algunos casos, el antígeno puede ser de un alérgeno alimentario y, en otros, puede ser de insectos.

55 En otro caso preferido el antígeno puede ser de un retrovirus (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-11; o VIH-1 (también conocidos como HTLV-111, LAV, ARV, hTLR, etc.)). En particular, del VIH y, en particular, los aislados HIVIIIb, HIVSF2, HTVLAV, HIVLAI, HIVMN; VIH-1CM235, HIV-1; o VIH-2. En una realización particularmente preferida, el antígeno puede ser un antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Los ejemplos de antígenos del VIH preferidos incluyen, por ejemplo, gp120, gp 160 gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas derivadas de las regiones del VIH pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu o LTR. En un caso particularmente preferido, el antígeno puede ser gp120 del VIH o una porción de gp120 del VIH. El antígeno puede ser de un virus de la inmunodeficiencia, y puede, por ejemplo, ser del SIV o un virus de la inmunodeficiencia felina.

65 El antígeno puede ser un antígeno modelo. El antígeno puede ser uno usado comúnmente en experimentos para evaluar las respuestas inmunes. Por ejemplo, el antígeno puede ser una lisozima y, en particular, lisozima de huevo de pollo. El antígeno puede ser la ovoalbúmina y, en particular, la ovoalbúmina de pollo.

Por lo tanto, el polipéptido codificado puede ser un antígeno, un fragmento inmunogénico del mismo o una de sus variantes inmunogénicas y, en particular, cualquiera de los antígenos mencionados en el presente documento, fragmentos inmunogénicos de los mismos o variantes inmunogénicas de cualquiera. El fragmento o la variante pueden tener, por ejemplo, cualquiera de los niveles de homología, proporción de longitud del antígeno original y funcionalidad especificados en el presente documento y, en particular, capacidad para dar lugar a una respuesta inmune.

En un ejemplo, una construcción de la descripción usa el promotor hCEFI para expresar un antígeno de la gripe, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de cualquiera. El fragmento y/o la variante pueden tener cualquiera de los niveles de homología de secuencia, longitudes de fragmentos y/o niveles de funcionalidad especificados en el presente documento. En particular, preferentemente, una secuencia de codificación de la construcción codifica un antígeno del virus de la gripe, un fragmento inmunogénico de un antígeno del virus de la gripe o una variante inmunogénica con 80 % de homología de aminoácidos con cualquiera de los anteriores, o incluso, con cualquiera de los niveles de identidad de secuencia especificados en el presente documento.

Por ejemplo, el antígeno de la gripe puede ser un antígeno NP de la gripe (nucleoproteína/proteína de la nucleocápside), HA (hemaglutinina), NA (neuraminidasa), M1, M2, PB1, PB2, PA, NS1 y/NS2, o puede ser un fragmento o variante de dichos antígenos. En una realización preferida, el antígeno codificado puede ser antígeno HA, NA y/o M2 de la gripe, o un fragmento o una variante de dichos antígenos. En un caso especialmente preferido, el antígeno codificado puede ser un antígeno HA o NA, o un fragmento o una variante de dichos antígenos y, en particular, un antígeno HA, o un fragmento o una variante de dicho antígeno.

En una realización preferida, el antígeno puede ser de la cepa H5N1 de la gripe, y se pueden emplear fragmentos inmunogénicos del mismo y variantes de cualquiera que conserve la inmunogenicidad. En particular, el antígeno puede ser uno de la cepa H5N1 o un fragmento de dicho antígeno. Se pueden emplear variantes, por ejemplo, con uno, dos, tres, cuatro, cinco o más cambios de aminoácidos, así como variantes con cualquiera de los niveles de identidad de secuencia, longitud y otras características especificadas en el presente documento. Del mismo modo, los fragmentos pueden tener cualquiera de los niveles de longitud y otros parámetros especificados en el presente documento.

El antígeno de la gripe puede ser de cualquier virus de la gripe. El antígeno puede ser del virus de la gripe A, B o C, en particular, de la gripe A y/o B. El antígeno puede ser, por ejemplo, de una de las cepas identificadas anualmente por la Organización Mundial de la Salud para su uso en vacunas contra la gripe y, en particular, puede ser un antígeno identificado por la OMS para dicho uso.

Entre los genes terapéuticos preferidos para la administración a células, y por consiguiente, para la expresión usando construcciones de la descripción están los factores hematopoyéticos, incluyendo el factor VIIa [patente de EE.UU. Nº 4.784.950]; Factor VIII [patentes de EE.UU. Nº 4.965.199; 4.868.112 [dominio B eliminado] y patente de EE.UU. Nº 5.661.008]; y el Factor IX [patente de EE.UU. Nº 4.994.371]. Otros genes preferidos son los que codifican enzimas lisosomales de almacenamiento, incluyendo los genes que codifican la glucocerebrosidasa [enfermedad de Gaucher; patentes de EE.UU. Nº 5.879.680; 5.236.838]; α -galactosidasa [enfermedad de Fabry; patente de EE.UU. Nº 5.401.650]; α -glucosidasa ácida [enfermedad de Pompe; WO00/12740]; α -nacetilgalactosaminidasa [enfermedad de Schindler; patente de EE.UU. Nº 5.382.524]; esfingomielinasa ácida [enfermedad de NiemannPick; patente de EE.UU. Nº 5.686.240]; α -iduronidasa [WO9310244A1]. Otros genes preferidos incluyen los genes para la distrofina, insulina y α -1-antitripsina.

En algunos casos, las construcciones de la descripción se pueden usar para expresar secuencias en células, tejidos u órganos afectados directamente por una afección. Por ejemplo, en la fibrosis quística, las construcciones de la descripción se pueden usar para expresar CFTR en las células del pulmón para corregir el órgano más afectado por la afección. En la distrofia muscular, el gen terapéutico se puede expresar, por ejemplo, en el músculo esquelético. En otros casos, la intención puede ser expresar secuencias en un tejido de modo que el polipéptido expresado se pueda liberar y actuar en otro tejido. Por lo tanto, en algunos casos, se puede usar un tipo de célula o tejido particular como fábrica para la producción de polipéptidos deseados. Los casos preferidos incluyen usar el pulmón, el hígado y/o el músculo para producir proteínas y, en particular, para secretar los polipéptidos que producen. Los ejemplos incluyen la producción de factores de coagulación para la hemofilia, enzimas metabólicas para defectos de almacenamiento lisosomal, la insulina para la diabetes, α -1-antitripsina para el enfisema. Dicha metodología se puede usar para cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento en las que el polipéptido no se tiene que expresar directamente en el tejido diana o se desea que el polipéptido seleccionado entre en sistemas tales como el sistema sanguíneo, de modo que el polipéptido sea transportado por el organismo.

En un caso adicional de la descripción, la descripción proporciona construcciones que expresan polipéptidos no terapéuticos. En un caso, dichas construcciones se pueden usar para producir determinados polipéptidos deseados en sistemas *in vitro* o, como alternativa, en animales no humanos.

Las construcciones de la descripción se pueden usar para expresar secuencias en animales agrícolas, incluyendo cualquiera de los mencionados en el presente documento. Dichas secuencias expresadas pueden ser terapéuticas o no terapéuticas. Las construcciones de la descripción se pueden usar para expresar cualquiera de los productos génicos mencionados en el presente documento para el tratamiento de enfermedades en animales. Los polipéptidos expresados pueden incluir secuencias apropiadas de modo que se secreten en la sangre o la leche para facilitar la recogida.

Las construcciones de la descripción se pueden usar para expresar polipéptidos que aumenten el valor de los animales agrícolas. Por ejemplo, se pueden usar para expresar construcciones que generen una mayor producción de carne en animales usados por su carne. Por ejemplo, una construcción de la descripción se puede usar para expresar hormonas y, en particular, la hormona del crecimiento, en particular, para mejorar la producción de carne. Una construcción de la descripción se puede usar para expresar somatotropina. En un caso particularmente preferido, una construcción de la invención se puede emplear para expresar una somatotropina para aumentar la producción de leche, particularmente en animales tales como vacas y cabras y, en particular, vacas lecheras, pudiéndose emplear la somatotropina en particular, la proteína bovina, fragmentos funcionales de la misma o variantes funcionales de cualquiera.

Para todas las secuencias expresadas mencionadas en el presente documento, se pueden emplear fragmentos funcionales de las secuencias específicas mencionadas, así como variantes funcionales de cualquiera. Por ejemplo, en el caso de los polipéptidos terapéuticos, siempre que el fragmento o las variantes conserven algún beneficio terapéutico, se pueden emplear, y el grado de funcionalidad puede ser cualquiera de los especificados en el presente documento.

En algunas realizaciones de la descripción, el promotor hCEFI se puede usar para expresar más de un polipéptido. Por lo tanto, en algunos casos, una secuencia transcrita puede dar lugar a múltiples polipéptidos, por ejemplo, una transcripción puede contener múltiples fases abiertas de lectura (ORF) y también uno o más sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para permitir la traducción de las ORF posteriores a la primera ORF. Una transcripción se puede traducir para dar un polipéptido que se escinda posteriormente, dando una pluralidad de polipéptidos. En algunos casos, una construcción de ácido nucleico de la descripción puede comprender múltiples promotores hCEFI y, por tanto, dar lugar a una pluralidad de transcripciones y, por consiguiente, a una pluralidad de polipéptidos. Las construcciones pueden expresar, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más polipéptidos a través de un promotor o promotores hCEFI.

En una realización especialmente preferida de la presente descripción, el promotor hCEFI se puede usar para expresar el polipéptido CFTR y, por tanto, la construcción se puede usar para tratar la fibrosis quística. La fibrosis quística (FQ) es una afección hereditaria que afecta a aproximadamente uno de cada 2.000 caucásicos. La afección está causada por mutaciones en el gen del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), que codifica un canal de cloruro regulado por AMPc expresado en la superficie de las células epiteliales [Riordan, J. R., *et al.*, *Science*, 1989. 245(4922): pág. 1066-73]. El canal de cloruro del CFTR tiene un papel importante en la regulación del transporte transepitelial de la sal y el agua. La anomalía o ausencia del CFTR puede generar la enfermedad en muchos órganos del cuerpo, pero la principal causa de morbilidad y mortalidad en la FQ es la enfermedad pulmonar [Pilewski, J. M. y R. A. Frizzell, *Physiol Rev*, 1999. 79 (1 Supl): pág. S215-55]. La secreción de cloruro defectuoso y la elevada absorción de sodio en las vías respiratorias producen el desarrollo de las secreciones de moco espeso en los pulmones y, posteriormente, la infección bacteriana crónica. A pesar de los avances en el tratamiento, esta afección sigue dando lugar, en última instancia, a la muerte, frecuentemente, a una edad adulta temprana [Pilewski *et al.*, 1999 *supra*]. Se predice que la transferencia de un gen de CFTR de tipo silvestre a las células de la glándula submucosa y epitelial bronquial proximal corrige el defecto del canal de cloruro en la FQ [Drumm, M. L., *et al.*, *Cell*, 1990. 62(6): pág. 1227-33 y Hyde, S. C., *et al.*, *Nature*, 1993. 362 (6417): pág. 250-5]. Las construcciones de la descripción se pueden usar para lograr la expresión en dichos tejidos y, en particular, en dichos tejidos en la fibrosis quística. Las construcciones se pueden administrar a través de cualquier medio apropiado para realizar la administración en dichos tejidos.

Los ensayos clínicos previos de evaluación de la administración de genes de CFTR mediada por vectores adenovirales manifestaron toxicidades limitantes a dosis pulmonares justo suficientes para detectar bajos niveles de expresión de CFTR [Crystal, R. G., *et al.*, *Nat Genet*, 1994. 8(1): pág. 42-51; Knowles, M. R., *et al.*, *N Engl J Med*, 1995. 333(13): pág. 823-31; Wilmott, R. W., *et al.*, *Hum Gene Ther*, 1996. 7(3): pág. 301-18; y Zabner, J., *et al.*, *J Clin Invest*, 1996. 97(6): p. 1504-11. Estudios similares que evalúan vectores virales adeno-asociados no han mostrado toxicidad, pero el nivel de la reconstitución funcional de CFTR ha sido modesto [Conrad, C. K., *et al.*, *Gene Ther*, 1996. 3(8): pág. 658-68, Aitken, M. L., *et al.*, *Hum Gene Ther*, 2001. 12(15): pág. 1907-16, Wagner, J. A., *et al.*, *Hum Gene Ther*, 2002. 13(11): pág. 1349-59, Flotte, T. R., *et al.*, *Hum Gene Ther*, 2003. 14(11): pág. 1079-88. Es importante destacar que la administración de cualquier vector viral conduce a la generación de anticuerpos neutralizantes que inhiben la eficacia de las administraciones posteriores [Zabner *et al.*, 1996, *supra*, Harvey, B. G., *et al.*, *J Clin Invest*, 1999. 104(9): pág. 1245-55, Sun, J. Y., *et al.*, *Gene Ther*, 2003. 10(11): pág. 964-76, Moss, R. B., *et al.*, *Chest*, 2004. 125(2): pág. 509-21].

Las construcciones de la presente descripción que expresan el CFTR se pueden usar para abordar los problemas observados en los ensayos de la técnica anterior de tratamiento genético de la FQ. En particular, como la invención proporciona construcciones con un contenido mínimo, o nulo, de dinucleótidos CpG, los síntomas gripales y la inflamación resultante de dichas secuencias se ha minimizado o eliminado. Además, el promotor hCEFI de la presente invención muestra una expresión de alto nivel y sostenida. Esto significa que la terapia que emplea las construcciones de la invención tendrá un efecto prolongado. Esto puede significar que la terapia se tenga que administrar con menor frecuencia, lo que es importante para las afecciones genéticas, en particular, cuando el defecto genético subyacente implica tratar la afección de manera continua. Esto puede ser particularmente importante para afecciones tales como la fibrosis quística, donde la expresión prolongada de CFTR ayudará a restablecer la función pulmonar durante más tiempo. Así pues, en un caso especialmente preferido, una construcción de la invención se puede usar en el tratamiento de una afección genética, en particular, de cualquiera de las mencionadas en el presente documento y, en especial, de la fibrosis quística.

Sujetos

En un aspecto, las construcciones de la invención se pueden administrar a un sujeto. En un caso preferido, las construcciones se administran a un mamífero. En un caso preferido, el sujeto es un ser humano y, en particular, el sujeto puede ser un ser humano a quien se pretende tratar un estado patológico, particularmente cualquiera de los mencionados en el presente documento.

En un aspecto adicional, el sujeto puede no ser un ser humano. En particular, las construcciones de la invención se pueden administrar a un animal no humano y, preferentemente, un mamífero no humano. Dichos sujetos pueden estar padeciendo alguna de las afecciones mencionadas en el presente documento. Las construcciones se pueden administrar, por ejemplo, a animales domésticos no humanos o un animal de valor agrícola. Por ejemplo, los sujetos pueden ser ganado, cerdos, caballos, ovejas o cabras, pudiendo ser animales deportivos tales como caballos y perros. El animal puede ser un animal de compañía tal como un perro o un gato. El animal puede ser un mono tal como un primate no humano, tal como un chimpancé, un gorila o un orangután. El sujeto puede ser un conejo.

Las construcciones de la invención se pueden administrar a sujetos aviares. Así pues, por ejemplo, las construcciones se pueden administrar a aves domésticas, salvajes y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos y gansos, incluyendo dichos animales usados por su carne.

En un caso preferido adicional, las construcciones de la invención se pueden administrar a roedores. Los ejemplos de roedores incluyen ratones, ratas, cobayas y hámsteres y, en particular, ratones y ratas, y especialmente ratones. Las construcciones se pueden administrar a dichos animales para evaluar su eficacia. También se pueden administrar para evaluar la funcionalidad de determinados elementos de la construcción y también la construcción en su conjunto. En un caso de la invención, una construcción de la invención se puede administrar a un modelo animal de cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento, incluyendo los modelos genéticos e inducidos. Por ejemplo, las construcciones se pueden administrar a modelos de ratones knock-out y transgénicos de cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento y, en un aspecto particularmente preferido, los modelos de ratones knock-out o transgénicos de la FQ pueden recibir una construcción de la invención y cualquier reversión en el fenotipo controlado.

El término "sujeto" no denota una edad en particular. Por lo tanto, se pretende englobar tanto a adultos como a individuos recién nacidos. En una realización, el sujeto es susceptible a o se encuentra en riesgo de padecer la enfermedad en cuestión. En una realización preferida adicional, el sujeto tiene una de las afecciones patológicas mencionadas en el presente documento. El sujeto puede tener un defecto genético para cuya corrección se ha diseñado la administración de la construcción y, en particular, cualquiera de las afecciones patológicas mencionadas en el presente documento.

Formulación y administración

Con respecto a la introducción de una construcción de la invención en células, tejidos u órganos, los métodos *in vitro* adecuados para la administración de ácidos nucleicos a dichas células son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, electroporación y microinyección directa en núcleos. Por lo tanto, la invención proporciona una célula transformada con una construcción de la invención. La invención proporciona una célula que comprende una construcción de la invención. En un caso, la presente invención proporciona una célula aislada o una población de células que comprende una construcción de la invención. La presente invención proporciona dichas células *in vitro*. Las células de la presente invención se pueden proporcionar en forma congelada para su almacenamiento en algunos casos.

Las construcciones de la invención se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada para la administración a un sujeto. Por ejemplo, pueden estar en forma de ADN desnudo o complejo con uno o más anfífilos catiónicos, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos (también denominados ADN/liposomas, ADN de plásmido/liposomas o Lipoplex). Las construcciones se pueden administrar bien directamente a un sujeto, o como alternativa,

administrarse *ex vivo* a células derivadas del sujeto, tras lo que las células se vuelven a implantar en el sujeto. En un caso preferido, las construcciones se administran directamente al sujeto.

5 En la administración de las construcciones de la invención, se puede usar cualquier vía de administración adecuada. Las construcciones se pueden administrar por vía enteral o parenteral, tal como por vía oral, bucal, anal, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, tópica, por inhalación, a través de aerosoles, subcutánea, intramuscular, intranasal o transmucosa. Las construcciones se pueden administrar mediante inyección sin aguja. Por lo tanto, la invención también proporciona partículas portadoras para la inyección sin aguja recubiertas con una construcción de la invención y dispositivos de inyección sin aguja cargados con dichas partículas portadoras recubiertas.

10 Preferentemente, las construcciones de la invención se pueden administrar por inhalación y/o por vía intranasal. Así pues, se pueden administrar a través de la nariz y/o la boca. Los métodos adecuados para la formulación y preparación de medicamentos para ser administrados por inhalación, instilación y por vía intranasal son bien conocidos en la técnica, y se pueden emplear en la presente invención. La administración intranasal puede ser, en algunos casos, en la forma de un pulverizado nasal de polvo fino o aerosol, o en casos particulares, en la forma de Dischaler® o Turbuhaler® modificado. Las construcciones también se pueden administrar por instilación. En una realización preferida, los medicamentos de la invención son adecuadas para la administración por inhalación. Para la terapia de inhalación, el medicamento puede estar, por ejemplo, en una solución útil para la administración con inhaladores de dosis medidas de aerosol líquido o en una forma adecuada para un inhalador de polvo seco. El medicamento puede estar presente en un blíster o una cápsula rompible.

15 En algunas realizaciones preferidas, los medicamentos de la presente invención se pueden formular en forma de aerosoles. La formulación de aerosoles farmacéuticos es rutinaria para los expertos en la materia, véase, por ejemplo, Sciarra, J. en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (*supra*). Los agentes se pueden formular en forma de aerosoles en solución, aerosoles en dispersión o suspensión de polvos secos, emulsiones o preparaciones semisólidas. El aerosol se puede administrar usando cualquier sistema propulsor conocido por los expertos en la materia. Los aerosoles se pueden aplicar en el tracto respiratorio superior, por ejemplo, por inhalación nasal, o en el tracto respiratorio inferior o en ambos. La parte del pulmón en la que se administra el medicamento puede estar determinada por el trastorno. En una realización particularmente preferida, la administración puede ser en, o conseguir la expresión en, las células de las glándulas submucosas y/o epiteliales bronquiales proximales.

20 En algunas realizaciones y, en particular, cuando se va a usar la administración intranasal, los medicamentos pueden comprender un humectante. Este puede ayudar a reducir o prevenir la sequedad de la membrana mucosa y a prevenir la irritación de las membranas. Los humectantes adecuados incluyen, por ejemplo, sorbitol, aceite mineral, aceite vegetal y glicerol; agentes calmantes; acondicionadores de membrana; edulcorantes; y sus combinaciones. Los medicamentos pueden comprender un tensioactivo. Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos no iónicos, aniónicos y catiónicos. Los ejemplos de tensioactivos que se pueden usar incluyen, por ejemplo, derivados de polioxietileno de ésteres parciales de ácidos grasos de anhídridos de sorbitol, tales como, por ejemplo, Tween 80, polioxil 40 estearato, polioxietileno 50 estearato, fusieatos, sales biliares y octoxinol.

25 Los medicamentos de la presente invención se pueden administrar, por ejemplo, con cualquier dispositivo adaptado para introducir una o más composiciones terapéuticas en el tracto respiratorio superior y/o inferior. En algunas realizaciones preferidas, los dispositivos de la presente invención pueden ser inhaladores de dosis medidas. Los dispositivos pueden estar adaptados para suministrar las composiciones terapéuticas de la invención en forma de una bruma finamente dispersa de líquido, espuma o polvo. El dispositivo puede usar un efecto piezoeléctrico o una vibración ultrasónica para desalojar polvo adherido a una superficie tal como una cinta con el fin de generar bruma adecuada para inhalación. Los dispositivos pueden usar cualquier sistema propulsor conocido por los expertos en la materia incluyendo, pero sin limitación, bombas, gas licuado, gas comprimido, y similares.

30 Por lo general, los dispositivos de la presente invención comprenden un recipiente con una o más válvulas a través de las cuales se desplaza el flujo de la composición terapéutica y un accionador para controlar el flujo. Los dispositivos adecuados para su uso en la presente invención se pueden ver, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (*supra*). Los dispositivos adecuados para la administración de las construcciones de la invención incluyen inhaladores y nebulizadores tales como los que se usan normalmente para administrar esteroides a los asmáticos. En algunos casos, donde el sujeto es, por ejemplo, un niño, se puede usar un espaciador para facilitar la administración eficaz desde el inhalador.

35 Hay varios diseños de inhaladores disponibles el mercado, y se pueden emplear para administrar los medicamentos de la invención. Estos incluyen los dispositivos Accuhaler, Aerohaler, Aerolizer, Airmax, Autohaler, Clickhaler, Diskhaler, inhalador Easi-Breathe, Fisonair, Integra, inhalador Jet, Miat-Haler, inhalador Novolizer, inhalador Pulvinal, Rotahaler, Spacehaler, Spinhaler, inhalador Synchroner y Turbuhaler.

40 Una construcción para su uso de acuerdo con la invención se administrará generalmente a través de las vías respiratorias, por ejemplo, en la cavidad nasal, la tráquea o los pulmones, pero en algunos casos, se puede permitir la administración intravenosa en el tejido pulmonar. Por ejemplo, se puede preferir la administración intravenosa de

- una construcción de acuerdo con la invención para tratar el cáncer de pulmón, pudiéndose acceder fácilmente al/a los tumor/es desde el lecho capilar pulmonar. Ya se han descrito diversos medios para dirigir construcciones recombinantes para la administración en tejidos y tumores específicos de agentes terapéuticos que se pueden aplicar a las construcciones de la invención. Los vectores para su uso de acuerdo con la invención se pueden administrar en las vías respiratorias, por ejemplo, mediante un catéter de alimentación introducido en la cavidad nasal o por medio de un broncoscopio. La administración para la terapia de acuerdo con la invención puede ser, sin embargo, más preferentemente, por medio de un nebulizador u otro dispositivo de pulverización, siempre que se mantenga la integridad del vector.
- En realizaciones en las que se desea administrar los medicamentos al o a través del tracto respiratorio, el tamaño de partícula del medicamento se puede seleccionar en base a la parte del tracto respiratorio en la que se desee administrar el medicamento.
- Los medicamentos de la invención pueden adoptar una variedad de formas. En los casos en que se van a administrar a través del tracto respiratorio pueden estar en forma de polvos, microesferas de polvo, soluciones, suspensiones, geles, suspensiones de nanopartículas, liposomas, emulsiones o microemulsiones. Los líquidos presentes pueden ser agua u otros disolventes adecuados, tales como CFC o HFA. En el caso de soluciones y suspensiones, estas pueden ser acuosas o implicar soluciones distintas del agua.
- En un caso particularmente preferido, las construcciones de la invención se administran al pulmón y, en particular, a las vías respiratorias del pulmón. En un caso especialmente preferido, la administración a las vías respiratorias se puede realizar mediante el uso de liposomas. En particular, la construcción puede formar un complejo con una formulación de transferencia génica a base de lípidos catiónicos y, en particular, con GL67 o PEI.
- Las construcciones de la invención se pueden formular como preparaciones farmacéuticas. Esto se puede realizar usando las químicas y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, que están disponibles para los expertos en la materia. Por ejemplo, las composiciones que contienen una o más construcciones se pueden combinar con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar una composición farmacéutica. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una construcción de la invención, y un vehículo y excipiente farmacéuticamente aceptable.
- Puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH y similares, en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares, generalmente, son agentes farmacéuticos que se pueden administrar sin generar toxicidad y que, en el caso de las composiciones de vacuna, no producirán una respuesta inmune en el individuo que reciba la composición. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. También se prefiere, aunque no es necesario, que la preparación contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable que sirva como estabilizante, en particular, para el péptido, proteína u otras moléculas similares, si se incluyen en la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados que también actúan como estabilizantes incluyen, sin limitación, calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, y similares. Otros vehículos adecuados incluyen, de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles de alto peso molecular (PEG), y combinaciones de los mismos. En REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991), se puede encontrar una descripción completa de excipientes, vehículos y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables. También se pueden incluir ciertos facilitadores de la absorción y/o expresión de ácido nucleico ("agentes facilitadores de la transfección") en las composiciones, por ejemplo, facilitadores tales como bupivacaína, cardiotoxina y sacarosa, y vehículos que facilitan la transfección tales como preparaciones de liposomas o lípidos usadas habitualmente para la administración de moléculas de ácido nucleico. Los liposomas aniónicos y neutros están ampliamente disponibles y son bien conocidos para la administración de moléculas de ácido nucleico (véase, por ejemplo, "Liposomes: A Practical Approach", (1990) RPC New Ed., IRL Press). Las preparaciones de lípidos catiónicos también son vehículos muy conocidos para su uso en la administración de moléculas de ácido nucleico. Las preparaciones de lípidos adecuadas incluyen DOTMA (cloruro de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonio), disponible con la marca comercial Lipofectina™, y DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano), véanse, por ejemplo, Felgner *et al.* (1987) *Pro. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 84:7413-7416; Malone *et al.* (1989) *Pro. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 86:6077-6081; patentes de EE.UU. Nº 5.283.185 y 5.527.928, y publicaciones internacionales Nº WO 90/11092, WO 91/15501 y WO 95/26356. Estos lípidos catiónicos se pueden usar preferentemente en asociación con un lípido neutro, por ejemplo, DOPE (dioleil fosfatidiletanolamina). Otras composiciones facilitadoras de la transfección que se pueden añadir a las preparaciones de lípidos o liposomas anteriores incluyen derivados de espermina (véase, por ejemplo, la publicación internacional Nº WO 93/18759) y compuestos de permeabilización de la membrana tales como GALA, Gramicidina S y sales biliares catiónicas (véase, por ejemplo, la publicación internacional Nº WO 93/19768).
- En una realización especialmente preferida de la invención, se puede administrar una construcción usando un lípido catiónico. En particular, se pueden emplear los lípidos catiónicos que comprenden un grupo espermina y

preferentemente un grupo espermina ligado a un anclaje de colesterol. En un caso preferido, dichos agentes se pueden emplear con DOPE, particularmente a relaciones molares de 1:1 a 1:5, y preferentemente de 1:1,5 a 1:2,5, y especialmente de 1:2. Una formulación especialmente preferida es el empleo de GL67 (Lee *et al.*, 1996, *Hum. Gen. Ther.* 7: 1701-1717). En un caso preferido adicional, se pueden usar lípidos catiónicos que comprenden un grupo espermina en combinación con PEG-DMP-5000 y, en particular, se puede usar GL-67 en combinación con una formulación de este tipo. En un caso, las relaciones molares empleadas pueden ser cualquiera de las mencionadas en relación con DOPE. Eastman, *et al.* (1997) *Hum Gene Ther* 8 (6): 765-73 describe el uso de PEG-DMP-5000.

En un caso, se pueden formular GL-67, DOPE y DMPE-PEG-5000 usando la construcción y, en particular, como se describe en Eastman *et al* y Lee *et al*, y también como se describe en los ejemplos. Por lo tanto, en un caso, se formulan GL-67, DOPE y DMPE-PEG-5000 y, por ejemplo, se liofilizan para el almacenamiento. Luego se puede volver a hidratar la formulación y prepararse los liposomas mediante métodos tales como agitación vorticial, se pueden añadir las construcciones mediante la combinación de volúmenes iguales de ADN y GL67 y, en particular, a una relación molar de 0,25:1 o, por ejemplo, de 1:16 a 1:1, preferentemente de 1:8 a 1:1, más preferentemente de 1:5 a 1:1. Para la aplicación por aerosol, por ejemplo, se pueden emplear relaciones molares de GL67 con respecto al plásmido de 0,1:1 a 1:1, preferentemente de 0,3:1 a 1:1 y en particular de 0,5:1 a 1:1 mM y, en particular, de 0,75:1 mM.

En otra realización especialmente preferida de la invención, la construcción de la invención se puede administrar usando polietilenimina (PEI) (Boussif *et al*, 1995, *PNAS* 92: 7297-301). En particular, se puede emplear PEI de 1 a 100 kd, preferentemente de 10 a 50 kd, preferentemente de 15 a 35 y en particular de 19 a 31 kd. Dichos PEI pueden ser ramificados o lineales y, en particular, ramificados. En un caso preferido, se pueden emplear PEI lineales de 22 kd y ramificados de 25 kd.

Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden encapsular, adsorber a o asociar con vehículos particulados. En particular, se pueden proporcionar en vehículos con núcleo para inyecciones sin aguja. Los vehículos particulados adecuados incluyen los derivados de polímeros de polimetilmetacrilato, así como micropartículas de PLG derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicólidos). Véase, por ejemplo, Jeffery *et al.* (1993) *Pharm. Res.* 10: 362-368. También se pueden usar otros sistemas particulados y polímeros, por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas. En una realización preferida, las construcciones de la invención se precipitan sobre vehículos en presencia de un agente de condensación de ácido nucleico y un agente quelante de iones metálicos. Los agentes de condensación preferidos incluyen polímeros catiónicos, en particular, poliaminas y, en particular, una poliargina o una polilisina. Se pueden emplear vehículos de núcleo metálico y, en particular, vehículos de núcleo de oro para la inyección sin aguja.

Las composiciones se administran a un sujeto en una cantidad que sea compatible con la formulación de dosificación y que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz apropiada estará un intervalo relativamente amplio, pero puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia mediante ensayos rutinarios. Las publicaciones "Physicians Desk Reference" y "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" son útiles para determinar la cantidad necesaria. Por ejemplo, generalmente, se espera que una dosis eficaz del polinucleótido esté en un intervalo de aproximadamente 0,001 µg a 1 g. En particular, se pueden administrar dosis de 0,1 a 500 mg, preferentemente de 10 a 400 mg, más preferentemente de 25 a 350 mg, incluso más preferentemente de 35 a 300 mg. En algunos casos, se puede administrar una dosis de aproximadamente 50 mg, 100 mg, 150 mg, 250 mg o 300 mg o una dosis de 25 mg de dichas dosis. En un caso preferido, las dosis se pueden aplicar para la administración por aerosol. En el caso de la administración intravenosa, la dosis puede ser, por ejemplo, cualquiera de las mencionadas y, en particular, puede estar en el intervalo de 0,1 a 100 mg, preferentemente de 0,5 a 25 mg, e incluso más preferentemente de 5 a 10 mg.

En algunos casos, tras una administración inicial, se puede realizar una administración posterior de la construcción. La administración se puede realizar, por ejemplo, al menos una semana, dos semanas, un mes, dos meses o seis meses después de la administración inicial. En algunos casos, las construcciones de la invención se pueden administrar al menos una vez a la semana, cada dos semanas, una vez al mes o a intervalos más prolongados. Las construcciones se pueden administrar, por ejemplo, a intervalos dictados por la reducción de los efectos de la administración anterior.

Cualquiera de las dos entidades de la invención se puede administrar por separado, secuencial o simultáneamente. Así pues, dos construcciones o más construcciones, donde al menos una construcción es una construcción de la invención, se pueden administrar por separado, simultánea o secuencialmente y, en particular, dos o más construcciones de la invención se pueden administrar de dicha manera. Las dos se pueden administrar en la misma o diferentes composiciones. En un caso preferido, las dos construcciones se pueden administrar en la misma composición.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una construcción de la invención y cualquiera de los otros agentes descritos en el presente documento.

Medicamentos y métodos

5 La invención también proporciona el uso de una construcción de la invención en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia. El método puede ser para tratar, prevenir o mejorar cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento. En un caso, el método puede ser un método de terapia génica. En otro caso, el método puede ser un método de vacunación o inmunización. En un caso, la vacunación o inmunización es para tratar, prevenir o mejorar una infección, una afección autoinmune, alergia o cáncer.

10 La invención también proporciona el uso de una construcción de la invención en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno genético, una afección crónica, cáncer, alergia, autoinmunidad, infección o un cáncer. En un caso preferido, la invención proporciona la fabricación de medicamentos para tratar cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento. En un caso particularmente preferido, la enfermedad por tratar es un trastorno de las vías respiratorias. En particular, el trastorno de las vías respiratorias se selecciona entre fibrosis quística, asma, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), bronquitis, edema pulmonar y cáncer de pulmón.

20 La descripción también proporciona un método de tratamiento de un trastorno que comprende la administración de una construcción de la invención en una cantidad eficaz a un sujeto que padece un trastorno de este tipo. Se puede tratar cualquiera de las afecciones mencionadas en el presente documento. La invención también proporciona agentes que comprenden construcciones de la invención y, opcionalmente, cualquiera de los otros números enteros especificados en el presente documento para su uso en el tratamiento de las afecciones mencionadas en el presente documento.

25 La presente invención también proporciona un método no terapéutico de expresión de una secuencia en un sujeto, método que comprende la administración de una construcción de la invención que codifica una secuencia no terapéutica para la expresión, en la que el promotor hCEFI está unido operativamente a una secuencia no terapéutica para la expresión.

30 La presente invención también proporciona un método de expresión *in vitro* o *ex vivo* de un gen en una célula, un tejido u un órgano, método que comprende introducir una construcción de la invención en dichas células, tejido u órgano.

Animales no humanos y células

35 En una realización adicional, la descripción proporciona un animal no humano o un ave que comprende una construcción de la invención. El animal no humano puede ser cualquiera de los mencionados en el presente documento y, en particular, puede ser un roedor o un animal de importancia agrícola, o un ave tal como, por ejemplo, las mencionadas en el presente documento.

40 Dichos animales no humanos pueden ser transgénicos y, por tanto, pueden comprender normalmente la construcción en todas las células de su organismo. En otros casos, la construcción solo puede estar presente, estar principalmente presente o estar presente casi en su totalidad en uno de los tejidos o tipos de células mencionados en el presente documento.

45 En una realización, la descripción proporciona, por tanto, un animal transgénico que comprende una construcción de la invención. Además, se puede usar la dirección de genes para introducir un promotor de la invención en una ubicación deseada del genoma de un animal.

50 Así pues, la invención también proporciona una construcción de dirección que comprende un promotor de la invención y, por lo general, al menos dos regiones de homología con el genoma del animal de destino a permitir la recombinación homóloga. La descripción también proporciona células madre no humanas aisladas y, en particular, células madre embrionarias que comprenden un promotor la invención, particularmente, uno introducido a través de la dirección de genes. En una realización adicional, se describen células madre humanas aisladas, incluyendo células madre embrionarias y no embrionarias y, en particular, células madre no embrionarias. Se describen células madre hematopoyéticas que comprenden una construcción de la descripción.

60 La presente descripción también proporciona células aisladas que comprenden una construcción de la invención y, en particular, de cualquiera de los tejidos mencionados en el presente documento. En particular, se proporcionan células hepáticas y pulmonares. También se describen tipos de células tales como células HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamíferos que comprenden promotores o construcciones de la invención.

EjemplosMateriales y métodos

65 Ratones

Se usaron ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas durante todo el estudio. Los ratones fueron alojados de acuerdo con las directrices éticas y de bienestar del ministerio del interior británico, y se alimentaron con comida y agua convencionales a voluntad, dejando que se aclimataran durante al menos 7 días antes de los procedimientos que se estaban realizando.

ADN de plásmido

El ADN de plásmido se preparó usando el kit de purificación de plásmidos EndoFree de QIAGEN (QIAGEN Ltd, Crawley, Reino Unido) o mediante un método patentado por Aldevron Inc (Fargo, ND, EE.UU.). En todos los casos, los niveles de contaminación de endotoxina fueron < 5 UE (unidades de endotoxina) por mg de ADN. El ADN se mantuvo en agua exenta de endonucleasa (Promega UK Ltd, Southampton, Reino Unido) a -80 °C.

Preparación de GL67/ADNp y PEI/ADNp para instilación

Se formó un complejo de ADN plasmídico con GL67 (GL67 = formulación de GL67, DOPE, DMPE-PEG-5000 descrita por Eastman, *et al.* (1997) *Hum Gene Ther* 8(6): 765-73 según lo descrito (Lee, *et al.* (1996) *Hum Gene Ther* 7(14): 1701-17). En pocas palabras, se hidrató GL67 liofilizado (Genzyme, Massachusetts, EE.UU.) hasta 1,21 mM con agua para inyección (WFI) (B. Braun Medical) y se prepararon los liposomas por agitación vorticial. Se prepararon complejos de ADN plasmídico y liposoma GL67 combinando volúmenes iguales de soluciones de ADN y GL67. Las formulaciones finales contenían 80 µg de ADN plasmídico complejado con GL67 en una relación molar de 0,25:1 en 100 µl de agua para inyección. Se administraron 100 µl de los complejos GL67/ADNp por instilación en el pulmón de los ratones.

Como alternativa, se formó un complejo de ADN plasmídico y polietilenimina (PEI) ramificada de 25 kDa (Sigma, Missouri, EE.UU.) esencialmente según lo descrito (Densmore, *et al* (2000). *Mol Ther* 1(2): 180-8). Se prepararon 4,3 mg/ml de soluciones de PEI (0,1 M de N) en PBS, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 4 °C durante no más de un mes. Para preparar PEI/ADNp a una proporción de N:P de 10:1, se mezclaron 25,8 µg de PEI con 20 µg de ADNp hasta un volumen total de 100 µl en WFI (0,2 mg/ml). Se administraron 100 µl de los complejos de PEI/ADNp en el pulmón de los ratones.

Instilación de ADN plasmídico en las vías respiratorias de los ratones

Se anestesiaron los ratones mediante exposición al anestésico volátil Metofane (metoxiflurano) (Mallinckrodt Veterinary Inc., Illinois, EE.UU.) hasta que se alcanzó un estado de la anestesia de equilibrio, según lo determinado por un nivel de respuesta a pellizcos en la planta del pie. Se administró el ADN plasmídico en cualquier formulación de administración a los pulmones a través de la nariz, mientras se mantenía verticalmente con la boca cerrada. Se mantuvo una sola gota continua pipeteando el volumen de dosis con una pipeta Gilson P200 (Gilson Inc., Middleton, WI, EE.UU.), siendo el líquido absorbido por el ratón al insuflar.

Preparación de GL67/ADNp y PEI/ADNp para aplicación por aerosol

Para los estudios de aplicación por aerosol, se preparó GL67/ADN plasmídico en una proporción de 0,75:1 mM. Los liposomas se generaron por hidratación de GL67 a 11,4 mM con WFI. Se formaron complejos entre 10 ml de la mezcla final que contenía 2,5 mg/ml de ADN plasmídico y GL67. Se preparó PEI/ADN plasmídico para una sola administración por aerosol a una concentración de 0,2 mg/ml en un volumen total de 10 ml en WFI, a una proporción de N:P de 10:1. Los complejos se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de la aplicación por aerosol.

Aplicación por aerosol de ADN plasmídico en las vías respiratorias de los ratones

Se dispusieron los ratones en el interior de una cámara de exposición de 8,4 l (dimensiones interiores de 24,6 cm x 24,6 cm x 13,8 cm). Se colocó un máximo de 36 ratones dentro de la cámara para cualquier exposición al aerosol dada, y se dejó que los ratones se movieran libremente por el interior de la cámara mientras duró el estudio. Una vez dentro de la cámara, se cerró la tapa y se selló usando cinta aislante de 38 mm de anchura para crear un sello hermético del aerosol. Se dispuso un total de 10 ml de formulación de transferencia de genes en el depósito de bien el nebulizador de chorro Aerotech II (CIS-US Inc, Bedford, MA, EE.UU.) (para los aerosoles de PEI/ADN) o el nebulizador de chorro PARI LC+ (PARI GmbH, Starnberg, Alemania) (para los aerosoles de GL67/ADN), y se generó el aerosol haciendo pasar gas comprimido desde un cilindro a través del dispositivo. El aerosol generado se dirigió desde el nebulizador de la cámara de exposición a lo largo de un tubo de PVC de 15 mm de diámetro interno conectado centralmente en el techo de la cámara por medio de un adaptador de poliacetilo construido especialmente para el estudio. Se ventiló el exceso de aerosol del interior de la cámara a la atmósfera por medio de un tubo de 10 mm de diámetro situado en un lado de la cámara y conectado a un filtro de aire Midistart 2000 PTFE de 0,2 µm (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) para los experimentos en los que se usó el nebulizador Aerotech II. No se incluyó filtro para los experimentos en los que se usó el nebulizador PARI LC+, pues se encontró que la retropresión

generada ponía en grave peligro la producción del aerosol. Se administraron por aerosol 10 ml de ambos complejos en aproximadamente 30 minutos.

Recogida de BALF y preparación de homogeneizados pulmonares de ratón

5 Cuando fue necesario, se sacrificaron los ratones por exposición a una concentración creciente de CO₂ o por dislocación cervical. Para recoger el BALF, se dejó la tráquea al descubierto y se canuló, se lavaron los pulmones cuatro veces con 1 ml de solución de BALF (1 PBS, BSA al 0,1 % p/v, EDTA 0,05 mM) extraída y mantenida en hielo. Se retiraron los pulmones y la tráquea en bloque y se incubaron en 200 µl de 1 x tampón de lisis indicador (RLB) (Promega, Southampton, Reino Unido) a 4 °C durante hasta 30 minutos antes de su almacenamiento a -80 °C. A continuación, se descongelaron los pulmones a temperatura ambiente y se homogeneizaron durante 15-30 segundos a la máxima potencia con un homogeneizador de tejidos Ultra-Turrax T8 (Janke y Kunkel GmbH, Staufen, Alemania). Se centrifugaron los lisados pulmonares durante 5 minutos a 16.000 rcf en un microcentrifugador. Se recogió el sobrenadante de lisado, se transfirió a una columna QIAshredder (Qiagen, Crawley, Reino Unido) y se centrifugó durante otros dos minutos. Se almacenaron los lisados a -80 °C y se descongelaron a temperatura ambiente antes de ensayarlos para determinar la actividad de la luciferasa y el contenido de proteína.

Análisis de BALF - Recuentos de neutrófilos y niveles de citoquinas

20 Se concentraron las células del BALF por centrifugación a 400 rcf durante 10 minutos a 4 °C. Se volvió a suspender el sedimento celular en 1,1 ml de solución de BALF; se recogió el sobrenadante y se conservó para el análisis por separado. Se retiró una muestra de 100 µl de las células resuspendidas para realizar el recuento de las células nucleadas. Se mezcló la muestra con un volumen igual de solución de Turks (ácido acético glacial al 3 % v/v, cristal violeta al 1 % v/v) y se contaron las células nucleadas en un hemacitómetro. Se cuantificaron los niveles de TNF-α, IL-12 e IFN-γ en el sobrenadante de BALF usando el ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA), kits de inmunoensayo Quantikine M (R & D Systems, Minneapolis, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Cuantificación de la actividad de la luciferasa

30 Se determinó la actividad de la luciferasa en lisados pulmonares usando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega, Southampton, Reino Unido) y un luminómetro TD-20/20 Turner Designs (Steptech Instrument Services). Se normalizó la actividad de la luciferasa frente a la proteína pulmonar total cuantificada usando el kit de ensayo convencional de proteínas II Bio-Rad (Bio-Rad, Larne, Reino Unido) usando un lector de placa de espectrofotómetro Spectramax 250 y el programa informático SOFTmax[®] Pro (Molecular Devices, Wokingham, Reino Unido).

Ejemplo 1

40 Para estudiar los efectos de los dinucleótidos CpG, se administraron diversas construcciones a ratones. Las construcciones se administraron en el pulmón de los ratones, y se midieron los niveles de citoquinas y neutrófilos del BALF para evaluar la inducción de la inflamación.

En la primera serie de experimentos, se administraron construcciones que comprendían lo siguiente:

- 45 (i) una construcción de primera generación del tipo representado en la Figura 7, que contenía 317 dinucleótidos CpG en la construcción;
 (ii) una construcción de segunda generación del tipo representado en la Figura 7, que contenía 193 dinucleótidos CpG en la construcción; y
 50 (iii) una construcción de tercera generación del tipo representado en la Figura 7, que contenía cero dinucleótidos CpG en la construcción.

Además, se emplearon ratones sin tratamiento previo. Se midieron los niveles de TNF-α, IFN-γ e IL-12, así como el número de neutrófilos del BALF. Los resultados obtenidos se muestran gráficamente en los cuatro gráficos de la Figura 4a. Estos muestran que la administración de construcciones que no comprenden dinucleótidos CpG elimina casi por completo el aumento de los marcadores inflamatorios medidos que se observan con las construcciones que comprenden dinucleótidos CpG.

En una serie adicional de experimentos, se midió el efecto de la adición de un solo dinucleótido CpG. Se administraron las siguientes construcciones:

- 60 (i) una construcción de primera generación del tipo representado en la Figura 7, que contenía 317 dinucleótidos CpG en la construcción;
 (ii) una construcción de tercera generación del tipo representado en la Figura 7, pero que se había modificado para volver a introducir un solo dinucleótido CpG; y
 65 (iii) una construcción de tercera generación del tipo representado en la Figura 7 con cero dinucleótidos CpG.

Los resultados obtenidos se muestran en los tres gráficos de la Figura 4b, y muestran que la adición de solo una secuencia CpG es suficiente para dirigirse a los síntomas gripales y la inflamación pulmonar.

5 Así pues, las construcciones que emplean cero dinucleótidos CpG ayudarán a eliminar los síntomas gripales y la inflamación pulmonar cuando las construcciones se administran *in vivo*.
Los plásmidos de primera generación tales como pCIK Lux y pUb Lux han sido descritos por Gill D. R. *et al* (2001) "Gene Therapy", octubre; 8 (20): 1539-1546.

10 Los plásmidos de tercera generación son derivados de pCpG-LacZ disponibles en Invivogen, cuya secuencia se puede encontrar en http://www.invivogen.com/sequence/pCpG-LacZ_Seq.rtf.

Para apoyar todavía más estas observaciones, la Figura 4c muestra los resultados obtenidos cuando los ratones reciben:

15 (i) la construcción pCIKLux - un plásmido de primera generación con 317 CpG;
(ii) pGM169 que contiene la secuencia de codificación de CFTR, la combinación del potenciador/promotor hCEFI, y ningún CpG. (PGM169 tiene la secuencia modificada de la SEC ID N° 2, en la que el nucleótido 2595 es C, el nucleótido 3234 es T y el nucleótido 3236 es C); y
20 (iii) agua - como control negativo.

Los resultados obtenidos muestran que, en ausencia de CpG, las construcciones han provocado una escasa o nula respuesta inflamatoria

25 Ejemplo 2

Los resultados obtenidos en el Ejemplo 1 mostraron que la eliminación de los dinucleótidos CpG eliminaba las respuestas inflamatorias no deseadas debidas a la presencia de los dinucleótidos. Sin embargo, las construcciones de tercera generación no lograron dar lugar a una expresión sostenida y de alto nivel. Por consiguiente, se realizaron otras modificaciones en las construcciones.

En particular, se generaron construcciones de cuarta generación introduciendo un promotor hCEFI que consistía en un potenciador CMV humano y el promotor EF1a humano. Además, se hicieron otras modificaciones para emplear un gen de resistencia a antibióticos alternativo y eliminar las regiones de unión a la matriz (MAR). La secuencia de las construcciones de cuarta generación ilustrativas se proporciona en la SEC ID N° 1 (construcción pGM160 con ninguna secuencia de codificación), SEC ID N° 2 (construcción pGM151 que codifica un polipéptido CFTR expresado a partir del promotor hCEFI y que ha sido optimizado en codones; se obtienen resultados similares usando una construcción de SEC ID N° 2 en la que el nucleótido 2595 es C y los nucleótidos 3234 y 3236 son T y C, respectivamente) y SEC ID N° 4 (construcción pGM144 que codifica un polipéptido de luciferasa de luciérnaga, soLux, expresado a partir del promotor hCEFI y que ha sido optimizado en codones.

Para evaluar la eficacia del promotor hCEFI, se usó la construcción pGM144. Se usó el gen de la luciferasa de luciérnaga (soLux) bajo el control transcripcional de hCEFI como gen indicador. El gen indicador de la luciferasa permite el control de la expresión desde el promotor hCEFI y, por lo tanto, se pueden medir el nivel y la duración de la expresión.

Para evaluar la eficacia de la administración en aerosol de pGM144 a los ratones, se usaron dos formulaciones diferentes, en concreto los aerosoles GL67 y PEI. La construcción pGM144 se evaluó de un lado a otro con una serie de diferentes construcciones.

50 En particular, usando los aerosoles GL67 que comprendían las construcciones, se administraron las siguientes construcciones:

(i) pGM144 (también conocido como pG4hCEFI soLux), que usa el promotor hCEFI para la expresión de la luciferasa y que tiene cero dinucleótidos CpG en la construcción;
55 (ii) pG2Ubc Lux (pGM105), que usa el promotor poliubiquitina C humano para la expresión y comprende 245 dinucleótidos CpG en la construcción;
(iii) pG4GZB soLux (pGM142), que usa el potenciador y el promotor CMV humano, y que tiene cero dinucleótidos CpG en la construcción;
60 (iv) pG4mCEFI soLux (pGM141), que emplea el potenciador CMV murino y el promotor EF1a humano, y que tiene cero dinucleótidos CpG en la construcción; y
(v) pG1 CMV lux (pCILux) que usa el promotor CMV IE y el potenciador para la expresión, y que comprende 317 dinucleótidos en la construcción.

65 Además, se administraron las siguientes construcciones usando el polímero catiónico PEI:

- (i) pGM144 (pG4hCEFI soLux), que usa el promotor hCEFI para la expresión de la luciferasa y que tiene cero dinucleótidos CpG en la construcción;
- (ii) pG4GZB soLux (pGM142), que usa el potenciador y el promotor CMV humano, y que tiene cero dinucleótidos CpG en la construcción;
- (iii) pG4 mCEFI soLux (pGM141), que emplea el potenciador CMV murino y el promotor EF1a humano, y tiene cero dinucleótidos CpG en la construcción; y
- (iv) pG3 mCEFI Lux (pGM139), una construcción adicional que emplea el potenciador CMV murino y el promotor EF1a humano, y que tiene cero dinucleótidos CpG en la construcción. La construcción también comprende regiones de unión a la matriz.

Inesperadamente, la construcción pGM144, en la que se emplea el promotor hCEFI de la invención, fue la única construcción que dio lugar a una expresión sostenida y de alto nivel con GL67 (Figura 5) y PEI (Figura 6). Ninguna de las otras construcciones dio lugar a una expresión comparable con la administración de GL67 o PEI. La otra única construcción que dio lugar a una expresión apreciable 28 días después de la administración fue el promotor poliubiquitina C humano presente en la construcción pG2 UBC Lux, que dio sustancialmente menos expresión que el promotor hCEFI.

Los resultados fueron sorprendentes, en particular, dado que la construcción pGM141 tiene un material compuesto de potenciador CMV murino y el promotor EF1a humano y, sin embargo, no da ninguna expresión significativa, mientras que el promotor hCEFI comprende un material compuesto de potenciador CMV humano y el promotor EF1a humano, y es muy superior. No hubo indicios de que el potenciador CMV murino en combinación con el promotor EF1a humano fuera algo más que funcional.

Los resultados obtenidos muestran que el promotor hCEFI se puede usar para obtener expresión sostenida y alta usando el gen indicador de la luciferasa como modelo para las secuencias de codificación en general. El modelo de pulmón de ratón sirve como un buen modelo *in vivo* y es particularmente útil para los trastornos de las vías respiratorias tales como la fibrosis quística.

Ejemplo 3

Los resultados obtenidos en el Ejemplo 2 mostraron que la combinación de promotor potenciador hCEFI exento de CpG en una estructura de plásmido exenta de CpG de cuarta generación (pGM144) dirigió una expresión sostenida y de alto nivel al formar un complejo bien con GL67 o con PEI y administrarlo en los pulmones del ratón.

En una serie adicional de experimentos, se evaluaron permutaciones alternativas de las versiones que contenían CpG y exentas de CpG del potenciador CMV humano, promotor del factor de alargamiento humano 1α y la estructura plasmídica.

Se formaron complejos entre las siguientes construcciones de expresión con GL67 y se administraron en los pulmones del ratón por aerosol.

- (i) pGM146 (también denominado PG2 EF1a Lux), una construcción de segunda generación que usa el promotor del factor de alargamiento nativo 1a para la expresión de la luciferasa. Es importante destacar que el promotor contiene 18 CpG dentro de la región promotora y un total de 245 CpG en toda la construcción.
- (ii) pGM147 (también denominada pG2 CEF1a Lux), una construcción de segunda generación que usa el potenciador CMV humano nativo acoplado al promotor del factor de alargamiento nativo 1a para la expresión de la luciferasa. Es importante destacar que la región promotora/potenciadora contiene 35 CpG dentro de la región promotora/potenciadora y un total de 262 CpG en toda la construcción.
- (iii) pGM157 (también denominada pG2 hCEFI Lux), una construcción de segunda generación que usa el potenciador CMV humano exento de CpG acoplado con el promotor del factor de alargamiento 1a exento de CpG (promotor/potenciador hCEFI) para la expresión de la luciferasa. Es importante destacar que la región promotora/potenciadora contiene 0 CpG dentro de la región potenciadora/promotora y un total de 149 CpG en toda la construcción.
- (iv) pGM144 (también denominado pG4 hCEFI soLux) descrito anteriormente, una construcción de cuarta generación que usa el potenciador CMV humano exento de CpG acoplado al promotor del factor de alargamiento 1a exento de CpG (el promotor potenciador hCEFI) para la expresión de la luciferasa. Es importante destacar que la totalidad de la construcción contiene 0 CpG.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8, la única construcción que dirigió la expresión sostenida de alto nivel en el pulmón murino fue pGM144 exenta de CpG, en la que la expresión fue dirigida por el potenciador/promotor hCEFI. El potenciador/promotor hCEFI en el contexto de una estructura de plásmido que contiene CpG de segunda generación (pGM157) dirigió la expresión transitoria de la luciferasa pulmonar. Además, el promotor del factor de alargamiento 1α que contenía CpG nativo con (pGM147) o sin (pGM146) el potenciador CMV humano dirigió la expresión transitoria de la luciferasa pulmonar.

Los resultados del Ejemplo 2 y 3 demuestran que, de las construcciones descritas, solo la combinación del potenciador/promotor hCEFI en el contexto de la estructura de plásmido de cuarta generación exenta de CpG dirige la expresión transgénica pulmonar sostenida y de alto nivel. Ni el uso del potenciador/promotor hCEFI en una estructura de plásmido de segunda generación ni el uso de combinaciones alternativas de potenciador/promotor en la estructura de plásmido de cuarta generación dirigió la expresión transgénica pulmonar sostenida y de alto nivel.

Ejemplo 4

Los resultados obtenidos en los Ejemplos 2 y 3 muestran que la combinación de promotor potenciador hCEFI exento de CpG en una estructura de plásmido exenta de CpG de cuarta generación (pGM144) dirige una expresión sostenida y de alto nivel cuando forma un complejo bien con GL67 o con PEI y se administra en los pulmones del ratón durante al menos 28 días.

En una serie adicional de experimentos, se evaluó la expresión génica pulmonar durante un período prolongado de tiempo tras la administración, y se comparó la expresión génica pulmonar con un derivado de pGM148 en el que se eliminó la versión exenta de CpG del potenciador CMV humano.

Se formaron complejos entre las siguientes construcciones de expresión y GL67, y se administraron en los pulmones del ratón por aerosol:

(i) pGM144 (también denominado pG4 hCEFI soLux) descrito anteriormente, una construcción de cuarta generación que usa el potenciador CMV humano exento de CpG acoplado al promotor del factor de alargamiento 1a exento de CpG (el promotor potenciador hCEFI) para la expresión de la luciferasa. Es importante destacar que toda la construcción contiene 0 CpG.

(ii) pGM148 (también denominado pG4 EFI soLux), que es una construcción de cuarta generación que usa solo el promotor del factor de alargamiento 1a exento de CpG para la expresión de la luciferasa. Es importante destacar que toda la construcción contiene 0 CpG.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9. La única construcción que dirigió una expresión en pulmón de ratón sostenida y de alto nivel fue pGM144 exenta de CpG, en la que la expresión fue dirigida por el potenciador/promotor hCEFI. El promotor EFI solo en el contexto de la estructura de plásmido exenta de CpG de cuarta generación (pGM148) dirigió una expresión de la luciferasa pulmonar irrelevante. Además, pGM144 muestra una expresión de la luciferasa pulmonar sostenida y de alto nivel durante al menos 56 días tras una sola administración.

Conclusiones

En la expresión de secuencias, se desea una expresión de alto nivel y sostenida. El promotor hCEFI proporciona dicha expresión y ha demostrado ser superior a una gran variedad de promotores. Además, también se desea la eliminación, o al menos la reducción, de la inflamación inducida por vectores cuando se administra *in vivo*. El trabajo descrito en el presente documento también muestra que la eliminación de secuencias CpG encontradas en los vectores de expresión de plásmidos comunes inhibe la inflamación asociada con dichas secuencias y, en particular, cuando las construcciones se administran en el pulmón. Por lo tanto, se puede conseguir la expresión de alto nivel y sostenida, y la reducción o eliminación de la inflamación no deseada.

Listado de secuencias

<110> Isis Innovation Limited

<120> Construcción

<130> JA38566P.WOP

<150> GB0606190.7

<151> 28-03-2006

<160>5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 2103

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> construcción de plásmido pGM160

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de restricción BglII
 <220>
 <221> potenciador
 <222> (7)..(308)
 10 <223> potenciador CMV humano

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (309)..(314)
 15 <223> sitio de restricción EcoRI

<220>
 <221 > promotor
 <222> (315)..(538)
 20 <223> promotor del factor de alargamiento humano 1 α

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (329)..(334)
 25 <223> sitio de la enzima de restricción SphI

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (539)..(569)
 30 <223> Exón

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (570)..(709)
 35 <223> Intrón

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (710)..(727)
 40 <223> Exón

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (728)..(733)
 45 <223> sitio de restricción NheI

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (734)..(734)
 50 <223> A incluido para evitar el dinucleótido CpG

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (735)..(740)
 55 <223> sitio de la enzima de restricción Apal

<220>
 <221 > señal de polyA
 <222> (740)..(941)
 60 <223> secuencia de poliadenilación del gen de la hormona del crecimiento bovina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (936)..(941)
 65 <223> sitio de restricción SphI de polyA

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (942)..(942)
 <223> A incluido para evitar el dinucleótido CpG

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (943)..(1214)
 <223> origen de replicación R6K

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1215)..(1215)
 <223> A incluido para evitar el dinucleótido CpG

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1216)..(1221)
 <223> sitio de restricción KpnI

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1222)..(2036)
 <223> marcador de resistencia a la kanamicina

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2038)..(2043)
 <223> sitio de restricción Bam HI

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2044)..(2049)
 <223> sitio de unión al ribosoma de Shine Delgarno

40
 <220>
 <221 > promotor
 <222> (2050)..(2103)
 <223> promotor bacteriano EM7

<400> 1

ES 2 527 425 T3

agatctgtta cataacttat ggtaaatggc ctgcctggct gactgcccaa tgaccctgc 60
 ccaatgatgt caataatgat gtatgttccc atgtaatgcc aatagggact ttccattgat 120
 gtcaatgggt ggagtattta tggtaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat 180
 gccaaagtatg ccccctattg atgtcaatga tggtaaattg cctgcctggc attatgacca 240
 gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc tatgtattag tcattgctat 300
 taccatggga attcactagt ggagaagagc atgcttgagg gctgagtgcc cctcagtggg 360
 cagagagcac atggcccaca gtccttgaga agttgggggg aggggtgggc aattgaactg 420
 gtgcctagag aagggtggggc ttgggtaaac tgggaaagtg atgtggtgta ctggctccac 480
 ctttttcccc aggggtggggg agaaccatat ataagtgcag tagtctctgt gaacattcaa 540
 gcttctgcct tctccctcct gtgagtttg taagtcactg actgtctatg cctgggaaag 600
 ggtgggcagg agatggggca gtgcaggaaa agtggcacta tgaaccctgc agccctagga 660
 atgcatctag acaattgtac taaccttctt ctctttctc tcctgacagg ttggtgtaca 720
 gtagcttgct agcagggccc tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc 780
 cctgtgcctt ccttgaccct ggaagggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag 840
 gaaattgcat tgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggtgg ggtggggcag 900
 gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg cagatcagca gttcaacctg 960
 ttgatagtat gtactaagct ctcatgttta atgtactaag ctctcatggt taatgaacta 1020
 aacctcatg gctaattgtac taagctctca tggctaattg actaagctct catgtttcat 1080
 gtactaagct ctcatgtttg aacaataaaa ttaatataaa tcagcaactt aatagcctc 1140
 taaggtttta agttttataa gaaaaaaaaag aatatataag gcttttaag gttttaaggt 1200
 ttcttaggtt atcctggtag cttagaaaaa ctcatccagc atcaaatgaa actgcaattt 1260
 attcatatca ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagt cttttctgta atgaaggaga 1320
 aaactcacc aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg tatctgtctg caattccaac 1380
 tcttccaaca tcaatacaac ctattaattt cccctcatca aaaataaggt tatcaagtga 1440
 gaaatcacca tgagtgacca ctgaatctgg tgagaatggc aaaagcttat gcatttcttt 1500
 ccagacttgt tcaacaggcc agccatttct ctcatcatca aaatcactgg catcaacca 1560
 accattattc attcttgatt gggcctgagc cagtctaaat actctatcag agttaaagg 1620
 acaattacaa acaggaatgg aatgcaatct tctcaggaac actgccaggg catcaacaat 1680
 attttcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgttttcc ctgggatggc 1740
 agtggtgagt aaccatgcat catcaggagt tctgataaaa tgcttgatgg ttggaagagg 1800
 cataaattca gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat tggcaacaga 1860
 acctttgcca tgtttcagaa acaactctgg ggcactctggc ttccataca atctatagat 1920
 tgtggcacct gattgcccaa cattatctct agccattta taccatata aatcagcatc 1980

catggttgaa ttaaatcttg gcctggagca agaggtttct ctttgaatat ggctcatgga 2040
 tccccctcta tagtgagttg tattatacta tgcagatata ctatgccaat gtttaattgt 2100
 caa 2103

5 <210>2
 <211> 6549
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> construcción de plásmido

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de enzima de restricción BglII

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(308)
 <223> potenciador CMV humano

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (309)..(314)
 <223> sitio de restricción Eco RI

30 <220>
 <221> promotor
 <222> (315)..(538)
 <223> promotor del factor de alargamiento humano 1 α

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (329)..(334)
 <223> sitio de restricción Sph I

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (539)..(569)
 <223> exón

45 <220>
 <221> Intrón
 <222> (570)..(709)
 <223> Intrón

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (710)..(727)
 <223> exón

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (728)..(733)
 <223> sitio de restricción Nhe I

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (733)..(737)
 <223> secuencia Kozak

<220>

<221 > CDS
 <222> (738)..(5180)
 <223> ADNc de CFTR optimizado en codones

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1183)..(1188)
 <223> sitio de restricción Sph I

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4865)..(4870)
 <223> sitio de restricción Bam HI

15 <220>
 <221 > señal de polyA
 <222> (5181)..(5186)
 <223> sitio de restricción Apal

20 <220>
 <221 > señal de polyA
 <222> (5186)..(5387)
 <223> secuencia poly A del gen de la hormona del crecimiento bovino

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5382)..(5387)
 <223> sitio de restricción Sph I de poly A

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5388)..(5388)
 <223> A incluido para evitar la aparición del dinucleótido cpg

35 <220>
 <221> rep_origin
 <222> (5389)..(5660)
 <223> origen de replicación R6K

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5661)..(5661)
 <223> A incluido para evitar la aparición del dinucleótido cpg

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5662)..(5667)
 <223> sitio de restricción kpn I

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5668)..(6483)

 <223> marcador de resistencia a la kanamicina

55 <221>misc_feature
 <222>(6484)..(6489)
 <223> sitio de restricción Bam Hi

60 <220>
 <221>misc_feature
 <222>(6490)..(6495)
 <223> sitio de unión al ribosoma de shine delgarno

65 <220>
 <221>promotor

ES 2 527 425 T3

<222> (6496)..(6549)

<223> promotor bacteriano EM7

<400> 2

```

agatctgtta cataacttat ggtaaattggc ctgcctggct gactgcccac tgacccttgc      60
ccaatgatgt caataatgat gtatgttccc atgtaatgcc aatagggact ttccattgat      120
gtcaatgggt ggagtattta tggttaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat      180
gccaaagtatg ccccctattg atgtcaatga tggtaaattgg cctgcctggc attatgcccac      240
gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc tatgtattag tcattgctat      300
taccatggga attcactagt ggagaagagc atgcttgagg gctgagtgcc cctcagtggg      360
cagagagcac atggcccaca gtccctgaga agttgggggg aggggtgggc aattgaaactg      420
gtgcctagag aagggtggggc ttgggtaaac tgggaaagtg atgtggtgta ctggctccac      480
ctttttcccc aggggtggggg agaaccatat ataagtgcag tagtctctgt gaacattcaa      540
gcttctgcct tctccctcct gtgagtttgg taagtcactg actgtctatg cctgggaaag      600
gggtgggcagg agatggggca gtgcaggaaa agtggcacta tgaaccctgc agccctagga      660
atgcatctag acaattgtac taaccttctt ctctttcctc tcttgacagg ttggtgtaca      720
gtagcttgct agccacc atg  cag  aga  agc  cct  ctg  gag  aag  gcc  tct  gtg      770
                   Met  Gln  Arg  Ser  Pro  Leu  Glu  Lys  Ala  Ser  Val
                   1                   5                   10

gtg  agc  aag  ctg  ttc  ttc  agc  tgg  acc  agg  ccc  atc  ctg  agg  aag  ggc      818
Val  Ser  Lys  Leu  Phe  Phe  Ser  Trp  Thr  Arg  Pro  Ile  Leu  Arg  Lys  Gly
                   15                   20                   25

tac  agg  cag  aga  ctg  gag  ctg  tct  gac  atc  tac  cag  atc  ccc  tct  gtg      866
Tyr  Arg  Gln  Arg  Leu  Glu  Leu  Ser  Asp  Ile  Tyr  Gln  Ile  Pro  Ser  Val
                   30                   35                   40

gac  tct  gct  gac  aac  ctg  tct  gag  aag  ctg  gag  agg  gag  tgg  gat  aga      914
Asp  Ser  Ala  Asp  Asn  Leu  Ser  Glu  Lys  Leu  Glu  Arg  Glu  Trp  Asp  Arg
                   45                   50                   55

gag  ctg  gcc  agc  aag  aag  aac  ccc  aag  ctg  atc  aat  gcc  ctg  agg  aga      962
Glu  Leu  Ala  Ser  Lys  Lys  Asn  Pro  Lys  Leu  Ile  Asn  Ala  Leu  Arg  Arg
60                   65                   70                   75

tgc  ttc  ttc  tgg  aga  ttc  atg  ttc  tat  ggc  atc  ttc  ctg  tac  ctg  ggg      1010
Cys  Phe  Phe  Trp  Arg  Phe  Met  Phe  Tyr  Gly  Ile  Phe  Leu  Tyr  Leu  Gly
                   80                   85                   90

gaa  gtg  acc  aag  gct  gtg  cag  cct  ctg  ctg  ctg  ggc  aga  atc  att  gcc      1058
Glu  Val  Thr  Lys  Ala  Val  Gln  Pro  Leu  Leu  Leu  Gly  Arg  Ile  Ile  Ala
                   95                   100                   105

agc  tat  gac  cct  gac  aac  aag  gag  gag  agg  agc  att  gcc  atc  tac  ctg      1106
Ser  Tyr  Asp  Pro  Asp  Asn  Lys  Glu  Glu  Arg  Ser  Ile  Ala  Ile  Tyr  Leu
                   110                   115                   120

ggc  att  ggc  ctg  tgc  ctg  ctg  ttc  att  gtg  agg  acc  ctg  ctg  ctg  cac      1154

```

ES 2 527 425 T3

Gly	Ile	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Phe	Ile	Val	Arg	Thr	Leu	Leu	Leu	His	
	125					130					135					
cct	gcc	atc	ttt	ggc	ctg	cac	cac	att	ggc	atg	cag	atg	agg	att	gcc	1202
Pro	Ala	Ile	Phe	Gly	Leu	His	His	Ile	Gly	Met	Gln	Met	Arg	Ile	Ala	155
140					145					150						
atg	ttc	agc	ctg	atc	tac	aag	aaa	acc	ctg	aag	ctg	tcc	agc	aga	gtg	1250
Met	Phe	Ser	Leu	Ile	Tyr	Lys	Lys	Thr	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Val	170
			160						165					170		
ctg	gac	aag	atc	agc	att	ggc	cag	ctg	gtg	agc	ctg	ctg	agc	aac	aac	1298
Leu	Asp	Lys	Ile	Ser	Ile	Gly	Gln	Leu	Val	Ser	Leu	Leu	Ser	Asn	Asn	185
			175					180					185			
ctg	aac	aag	ttt	gat	gag	ggc	ctg	gcc	ctg	gcc	cac	ttt	gtg	tgg	att	1346
Leu	Asn	Lys	Phe	Asp	Glu	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	His	Phe	Val	Trp	Ile	200
		190					195					200				
gcc	cct	ctg	cag	gtg	gcc	ctg	ctg	atg	ggc	ctg	att	tgg	gag	ctg	ctg	1394
Ala	Pro	Leu	Gln	Val	Ala	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Ile	Trp	Glu	Leu	Leu	215
	205					210					215					
cag	gcc	tct	gcc	ttt	tgt	ggc	ctg	ggc	ttc	ctg	att	gtg	ctg	gcc	ctg	1442
Gln	Ala	Ser	Ala	Phe	Cys	Gly	Leu	Gly	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Ala	Leu	235
220					225					230					235	
ttt	cag	gct	ggc	ctg	ggc	agg	atg	atg	atg	aag	tac	agg	gac	cag	agg	1490
Phe	Gln	Ala	Gly	Leu	Gly	Arg	Met	Met	Met	Lys	Tyr	Arg	Asp	Gln	Arg	250
				240					245					250		
gca	ggc	aag	atc	agt	gag	agg	ctg	gtg	atc	acc	tct	gag	atg	att	gag	1538
Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Glu	Arg	Leu	Val	Ile	Thr	Ser	Glu	Met	Ile	Glu	265
			255					260					265			
aac	atc	cag	tct	gtg	aag	gcc	tac	tgt	tgg	gag	gaa	gct	atg	gag	aag	1586
Asn	Ile	Gln	Ser	Val	Lys	Ala	Tyr	Cys	Trp	Glu	Glu	Ala	Met	Glu	Lys	280
		270					275					280				
atg	att	gaa	aac	ctg	agg	cag	aca	gag	ctg	aag	ctg	acc	agg	aag	gct	1634
Met	Ile	Glu	Asn	Leu	Arg	Gln	Thr	Glu	Leu	Lys	Leu	Thr	Arg	Lys	Ala	295
	285					290					295					
gcc	tat	gtg	aga	tac	ttc	aac	agc	tct	gcc	ttc	ttc	ttc	tct	ggc	ttc	1682
Ala	Tyr	Val	Arg	Tyr	Phe	Asn	Ser	Ser	Ala	Phe	Phe	Phe	Ser	Gly	Phe	315
	300				305					310					315	
ttt	gtg	gtg	ttc	ctg	tct	gtg	ctg	ccc	tat	gcc	ctg	atc	aag	ggg	atc	1730
Phe	Val	Val	Phe	Leu	Ser	Val	Leu	Pro	Tyr	Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Ile	330
				320					325					330		
atc	ctg	aga	aag	att	ttc	acc	acc	atc	agc	ttc	tgc	att	gtg	ctg	agg	1778
Ile	Leu	Arg	Lys	Ile	Phe	Thr	Thr	Ile	Ser	Phe	Cys	Ile	Val	Leu	Arg	345
			335					340					345			
atg	gct	gtg	acc	aga	cag	ttc	ccc	tgg	gct	gtg	cag	acc	tgg	tat	gac	1826
Met	Ala	Val	Thr	Arg	Gln	Phe	Pro	Trp	Ala	Val	Gln	Thr	Trp	Tyr	Asp	360
		350					355					360				
agc	ctg	ggg	gcc	atc	aac	aag	atc	cag	gac	ttc	ctg	cag	aag	cag	gag	1874
Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Lys	Ile	Gln	Asp	Phe	Leu	Gln	Lys	Gln	Glu	375
	365					370					375					
tac	aag	acc	ctg	gag	tac	aac	ctg	acc	acc	aca	gaa	gtg	gtg	atg	gag	1922
Tyr	Lys	Thr	Leu	Glu	Tyr	Asn	Leu	Thr	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Met	Glu	

ES 2 527 425 T3

380					385					390					395	
aat	gtg	aca	gcc	ttc	tgg	gag	gag	ggc	ttt	ggg	gag	ctg	ttt	gag	aag	1970
Asn	Val	Thr	Ala	Phe	Trp	Glu	Glu	Gly	Phe	Gly	Glu	Leu	Phe	Glu	Lys	
				400					405					410		
gcc	aag	cag	aac	aac	aac	aac	aga	aag	acc	agc	aat	ggg	gat	gac	tcc	2018
Ala	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Asn	Arg	Lys	Thr	Ser	Asn	Gly	Asp	Asp	Ser	
			415					420					425			
ctg	ttc	ttc	tcc	aac	ttc	tcc	ctg	ctg	ggc	aca	cct	gtg	ctg	aag	gac	2066
Leu	Phe	Phe	Ser	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Gly	Thr	Pro	Val	Leu	Lys	Asp	
		430					435					440				
atc	aac	ttc	aag	att	gag	agg	ggg	cag	ctg	ctg	gct	gtg	gct	gga	tct	2114
Ile	Asn	Phe	Lys	Ile	Glu	Arg	Gly	Gln	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Gly	Ser	
	445					450					455					
aca	ggg	gct	ggc	aag	acc	agc	ctg	ctg	atg	atg	atc	atg	ggg	gag	ctg	2162
Thr	Gly	Ala	Gly	Lys	Thr	Ser	Leu	Leu	Met	Met	Ile	Met	Gly	Glu	Leu	
460					465					470					475	
gag	cct	tct	gag	ggc	aag	atc	aag	cac	tct	ggc	agg	atc	agc	ttt	tgc	2210
Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Lys	Ile	Lys	His	Ser	Gly	Arg	Ile	Ser	Phe	Cys	
				480					485					490		
agc	cag	ttc	agc	tgg	atc	atg	cct	ggc	acc	atc	aag	gag	aac	atc	atc	2258
Ser	Gln	Phe	Ser	Trp	Ile	Met	Pro	Gly	Thr	Ile	Lys	Glu	Asn	Ile	Ile	
			495					500					505			
ttt	gga	gtg	agc	tat	gat	gag	tac	aga	tac	agg	agt	gtg	atc	aag	gcc	2306
Phe	Gly	Val	Ser	Tyr	Asp	Glu	Tyr	Arg	Tyr	Arg	Ser	Val	Ile	Lys	Ala	
		510					515					520				
tgc	cag	ctg	gag	gag	gac	atc	agc	aag	ttt	gct	gag	aag	gac	aac	att	2354
Cys	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Ile	Ser	Lys	Phe	Ala	Glu	Lys	Asp	Asn	Ile	
	525					530					535					
gtg	ctg	ggg	gag	gga	ggc	att	aca	ctg	tct	ggg	ggc	cag	aga	gcc	aga	2402
Val	Leu	Gly	Glu	Gly	Gly	Ile	Thr	Leu	Ser	Gly	Gly	Gln	Arg	Ala	Arg	
540					545					550					555	
atc	agc	ctg	gcc	agg	gct	gtg	tac	aag	gat	gct	gac	ctg	tac	ctg	ctg	2450
Ile	Ser	Leu	Ala	Arg	Ala	Val	Tyr	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu	Tyr	Leu	Leu	
				560					565					570		
gac	tcc	ccc	ttt	ggc	tac	ctg	gat	gtg	ctg	aca	gag	aag	gag	att	ttt	2498
Asp	Ser	Pro	Phe	Gly	Tyr	Leu	Asp	Val	Leu	Thr	Glu	Lys	Glu	Ile	Phe	
			575					580					585			
gag	agc	tgt	gtg	tgc	aag	ctg	atg	gcc	aac	aag	acc	aga	atc	ctg	gtg	2546
Glu	Ser	Cys	Val	Cys	Lys	Leu	Met	Ala	Asn	Lys	Thr	Arg	Ile	Leu	Val	
		590					595					600				
acc	agc	aag	atg	gag	cac	ctg	aag	aag	gct	gac	aag	atc	ctg	atc	ctg	2594
Thr	Ser	Lys	Met	Glu	His	Leu	Lys	Lys	Ala	Asp	Lys	Ile	Leu	Ile	Leu	
	605					610					615					
aat	gag	ggc	agc	agc	tac	ttc	tat	ggg	acc	ttc	tct	gag	ctg	cag	aac	2642
Asn	Glu	Gly	Ser	Ser	Tyr	Phe	Tyr	Gly	Thr	Phe	Ser	Glu	Leu	Gln	Asn	
					625					630					635	
ctg	cag	cct	gac	ttc	agc	tct	aag	ctg	atg	ggc	tgt	gac	agc	ttt	gac	2690
Leu	Gln	Pro	Asp	Phe	Ser	Ser	Lys	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Ser	Phe	Asp	
				640					645					650		

cag Gln	ttc Phe	tct Ser	gct Ala 655	gag Glu	agg Arg	agg Arg	aac Asn	agc Ser 660	atc Ile	ctg Leu	aca Thr	gag Glu	acc Thr 665	ctg Leu	cac His	2738
aga Arg	ttc Phe	agc Ser 670	ctg Leu	gag Glu	gga Gly	gat Asp	gcc Ala 675	cct Pro	gtg Val	agc Ser	tgg Trp	aca Thr 680	gag Glu	acc Thr	aag Lys	2786
aag Lys	cag Gln 685	agc Ser	ttc Phe	aag Lys	cag Gln	aca Thr 690	ggg Gly	gag Glu	ttt Phe	ggg Gly 695	gag Glu	aag Lys	agg Arg	aag Lys	aac Asn	2834
tcc Ser 700	atc Ile	ctg Leu	aac Asn	ccc Pro	atc Ile 705	aac Asn	agc Ser	atc Ile	agg Arg	aag Lys 710	ttc Phe	agc Ser	att Ile	gtg Val	cag Gln 715	2882
aaa Lys	acc Thr	ccc Pro	ctg Leu	cag Gln 720	atg Met	aat Asn	ggc Gly	att Ile	gag Glu 725	gaa Glu	gat Asp	tct Ser	gat Asp	gag Glu 730	ccc Pro	2930
ctg Leu	gag Glu	agg Arg	aga Arg 735	ctg Leu	agc Ser	ctg Leu	gtg Val	cct Pro 740	gat Asp	tct Ser	gag Glu	cag Gln	gga Gly 745	gag Glu	gcc Ala	2978
atc Ile	ctg Leu	cct Pro 750	agg Arg	atc Ile	tct Ser	gtg Val	atc Ile 755	agc Ser	aca Thr	ggc Gly	cct Pro	aca Thr 760	ctg Leu	cag Gln	gcc Ala	3026
aga Arg	agg Arg 765	agg Arg	cag Gln	tct Ser	gtg Val	ctg Leu 770	aac Asn	ctg Leu	atg Met	acc Thr	cac His 775	tct Ser	gtg Val	aac Asn	cag Gln	3074
ggc Gly 780	cag Gln	aac Asn	atc Ile	cac His	agg Arg 785	aaa Lys	acc Thr	aca Thr	gcc Ala	tcc Ser 790	acc Thr	agg Arg	aaa Lys	gtg Val	agc Ser 795	3122
ctg Leu	gcc Ala	cct Pro	cag Gln	gcc Ala 800	aat Asn	ctg Leu	aca Thr	gag Glu	ctg Leu 805	gac Asp	atc Ile	tac Tyr	agc Ser	agg Arg 810	agg Arg	3170
ctg Leu	tct Ser	cag Gln	gag Glu 815	aca Thr	ggc Gly	ctg Leu	gag Glu	att Ile 820	tct Ser	gag Glu	gag Glu	atc Ile	aat Asn 825	gag Glu	gag Glu	3218
gac Asp	ctg Leu	aaa Lys 830	gag Glu	tgc Cys	ctg Leu	ttt Phe	gat Asp 835	gac Asp	atg Met	gag Glu	agc Ser	atc Ile 840	cct Pro	gct Ala	gtg Val	3266
acc Thr	acc Thr 845	tgg Trp	aac Asn	acc Thr	tac Tyr	ctg Leu 850	aga Arg	tac Tyr	atc Ile	aca Thr	gtg Val 855	cac His	aag Lys	agc Ser	ctg Leu	3314
atc Ile 860	ttt Phe	gtg Val	ctg Leu	atc Ile	tgg Trp 865	tgc Cys	ctg Leu	gtg Val	atc Ile	ttc Phe 870	ctg Leu	gct Ala	gaa Glu	gtg Val	gct Ala 875	3362
gcc Ala	tct Ser	ctg Leu	gtg Val	gtg Val 880	ctg Leu	tgg Trp	ctg Leu	ctg Leu	gga Gly 885	aac Asn	acc Thr	cca Pro	ctg Leu	cag Gln 890	gac Asp	3410
aag Lys	ggc Gly	aac Asn	agc Ser 895	acc Thr	cac His	agc Ser	agg Arg	aac Asn 900	aac Asn	agc Ser	tat Tyr	gct Ala	gtg Val 905	atc Ile	atc Ile	3458

ES 2 527 425 T3

acc tcc acc tcc agc tac tat gtg ttc tac atc tat gtg gga gtg gct	3506
Thr Ser Thr Ser Ser Tyr Tyr Val Phe Tyr Ile Tyr Val Gly Val Ala	
910 915 920	
gat acc ctg ctg gct atg ggc ttc ttt aga ggc ctg ccc ctg gtg cac	3554
Asp Thr Leu Leu Ala Met Gly Phe Phe Arg Gly Leu Pro Leu Val His	
925 930 935	
aca ctg atc aca gtg agc aag atc ctc cac cac aag atg ctg cac tct	3602
Thr Leu Ile Thr Val Ser Lys Ile Leu His His Lys Met Leu His Ser	
940 945 950	
gtg ctg cag gct cct atg agc acc ctg aat acc ctg aag gct ggg ggc	3650
Val Leu Gln Ala Pro Met Ser Thr Leu Asn Thr Leu Lys Ala Gly Gly	
960 965 970	
atc ctg aac aga ttc tcc aag gat att gcc atc ctg gat gac ctg ctg	3698
Ile Leu Asn Arg Phe Ser Lys Asp Ile Ala Ile Leu Asp Asp Leu Leu	
975 980 985	
cct ctc acc atc ttt gac ttc atc cag ctg ctg ctg att gtg att ggg	3746
Pro Leu Thr Ile Phe Asp Phe Ile Gln Leu Leu Leu Ile Val Ile Gly	
990 995 1000	
gcc att gct gtg gtg gca gtg ctg cag ccc tac atc ttt gtg gcc	3791
Ala Ile Ala Val Val Ala Val Leu Gln Pro Tyr Ile Phe Val Ala	
1005 1010 1015	
aca gtg cct gtg att gtg gcc ttc atc atg ctg agg gcc tac ttt	3836
Thr Val Pro Val Ile Val Ala Phe Ile Met Leu Arg Ala Tyr Phe	
1020 1025 1030	
ctg cag acc tcc cag cag ctg aag cag ctg gag tct gag ggc aga	3881
Leu Gln Thr Ser Gln Gln Leu Lys Gln Leu Glu Ser Glu Gly Arg	
1035 1040 1045	
agc ccc atc ttc acc cac ctg gtg aca agc ctg aag ggc ctg tgg	3926
Ser Pro Ile Phe Thr His Leu Val Thr Ser Leu Lys Gly Leu Trp	
1050 1055 1060	
acc ctg aga gcc ttt ggc agg cag ccc tac ttt gag acc ctg ttc	3971
Thr Leu Arg Ala Phe Gly Arg Gln Pro Tyr Phe Glu Thr Leu Phe	
1065 1070 1075	
cac aag gcc ctg aac ctg cac aca gcc aac tgg ttc ctc tac ctg	4016
His Lys Ala Leu Asn Leu His Thr Ala Asn Trp Phe Leu Tyr Leu	
1080 1085 1090	
tcc acc ctg aga tgg ttc cag atg aga att gag atg atc ttt gtc	4061
Ser Thr Leu Arg Trp Phe Gln Met Arg Ile Glu Met Ile Phe Val	
1095 1100 1105	
atc ttc ttc att gct gtg acc ttc atc agc att ctg acc aca gga	4106
Ile Phe Phe Ile Ala Val Thr Phe Ile Ser Ile Leu Thr Thr Gly	
1110 1115 1120	
gag gga gag ggc aga gtg ggc att atc ctg acc ctg gcc atg aac	4151
Glu Gly Glu Gly Arg Val Gly Ile Ile Leu Thr Leu Ala Met Asn	
1125 1130 1135	
atc atg agc aca ctg cag tgg gca gtg aac agc agc att gat gtg	4196
Ile Met Ser Thr Leu Gln Trp Ala Val Asn Ser Ser Ile Asp Val	
1140 1145 1150	
gac agc ctg atg agg agt gtg agc aga gtg ttc aag ttc att gat	4241

ES 2 527 425 T3

Asp	Ser	Leu	Met	Arg	Ser	Val	Ser	Arg	Val	Phe	Lys	Phe	Ile	Asp	
	1155					1160					1165				
atg	ccc	aca	gag	ggc	aag	cct	acc	aag	agc	acc	aag	ccc	tac	aag	4286
Met	Pro	Thr	Glu	Gly	Lys	Pro	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Pro	Tyr	Lys	
	1170					1175					1180				
aat	ggc	cag	ctg	agc	aaa	gtg	atg	atc	att	gag	aac	agc	cat	gtg	4331
Asn	Gly	Gln	Leu	Ser	Lys	Val	Met	Ile	Ile	Glu	Asn	Ser	His	Val	
	1185					1190					1195				
aag	aag	gat	gat	atc	tgg	ccc	agt	gga	ggc	cag	atg	aca	gtg	aag	4376
Lys	Lys	Asp	Asp	Ile	Trp	Pro	Ser	Gly	Gly	Gln	Met	Thr	Val	Lys	
	1200					1205					1210				
gac	ctg	aca	gcc	aag	tac	aca	gag	ggg	ggc	aat	gct	atc	ctg	gag	4421
Asp	Leu	Thr	Ala	Lys	Tyr	Thr	Glu	Gly	Gly	Asn	Ala	Ile	Leu	Glu	
	1215					1220					1225				
aac	atc	tcc	ttc	agc	atc	tcc	cct	ggc	cag	aga	gtg	gga	ctg	ctg	4466
Asn	Ile	Ser	Phe	Ser	Ile	Ser	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Gly	Leu	Leu	
	1230					1235					1240				
gga	aga	aca	ggc	tct	ggc	aag	tct	acc	ctg	ctg	tct	gcc	ttc	ctg	4511
Gly	Arg	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu	Leu	Ser	Ala	Phe	Leu	
	1245					1250					1255				
agg	ctg	ctg	aac	aca	gag	gga	gag	atc	cag	att	gat	gga	gtg	tcc	4556
Arg	Leu	Leu	Asn	Thr	Glu	Gly	Glu	Ile	Gln	Ile	Asp	Gly	Val	Ser	
	1260					1265					1270				
tgg	gac	agc	atc	aca	ctg	cag	cag	tgg	agg	aag	gcc	ttt	ggg	gtg	4601
Trp	Asp	Ser	Ile	Thr	Leu	Gln	Gln	Trp	Arg	Lys	Ala	Phe	Gly	Val	
	1275					1280					1285				
atc	ccc	cag	aaa	gtg	ttc	atc	ttc	agt	ggc	acc	ttc	agg	aag	aac	4646
Ile	Pro	Gln	Lys	Val	Phe	Ile	Phe	Ser	Gly	Thr	Phe	Arg	Lys	Asn	
	1290					1295					1300				
ctg	gac	ccc	tat	gag	cag	tgg	tct	gac	cag	gag	att	tgg	aaa	gtg	4691
Leu	Asp	Pro	Tyr	Glu	Gln	Trp	Ser	Asp	Gln	Glu	Ile	Trp	Lys	Val	
	1305					1310					1315				
gct	gat	gaa	gtg	ggc	ctg	aga	agt	gtg	att	gag	cag	ttc	cct	ggc	4736
Ala	Asp	Glu	Val	Gly	Leu	Arg	Ser	Val	Ile	Glu	Gln	Phe	Pro	Gly	
	1320					1325					1330				
aag	ctg	gac	ttt	gtc	ctg	gtg	gat	ggg	ggc	tgt	gtg	ctg	agc	cat	4781
Lys	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Val	Asp	Gly	Gly	Cys	Val	Leu	Ser	His	
	1335					1340					1345				
ggc	cac	aag	cag	ctg	atg	tgc	ctg	gcc	aga	tca	gtg	ctg	agc	aag	4826
Gly	His	Lys	Gln	Leu	Met	Cys	Leu	Ala	Arg	Ser	Val	Leu	Ser	Lys	
	1350					1355					1360				
gcc	aag	atc	ctg	ctg	ctg	gat	gag	cct	tct	gcc	cac	ctg	gat	cct	4871
Ala	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Glu	Pro	Ser	Ala	His	Leu	Asp	Pro	
	1365					1370					1375				
gtg	acc	tac	cag	atc	atc	agg	agg	acc	ctc	aag	cag	gcc	ttt	gct	4916
Val	Thr	Tyr	Gln	Ile	Ile	Arg	Arg	Thr	Leu	Lys	Gln	Ala	Phe	Ala	
	1380					1385					1390				
gac	tgc	aca	gtc	atc	ctg	tgt	gag	cac	agg	att	gag	gcc	atg	ctg	4961
Asp	Cys	Thr	Val	Ile	Leu	Cys	Glu	His	Arg	Ile	Glu	Ala	Met	Leu	

ES 2 527 425 T3

1395	1400	1405	
gag tgc cag cag ttc ctg gtg att gag gag aac aaa gtg agg cag Glu Cys Gln Gln Phe Leu Val Ile Glu Glu Asn Lys Val Arg Gln 1410 1415 1420			5006
tat gac agc atc cag aag ctg ctg aat gag agg agc ctg ttc agg Tyr Asp Ser Ile Gln Lys Leu Leu Asn Glu Arg Ser Leu Phe Arg 1425 1430 1435			5051
cag gcc atc agc ccc tct gat aga gtg aag ctg ttc ccc cac agg Gln Ala Ile Ser Pro Ser Asp Arg Val Lys Leu Phe Pro His Arg 1440 1445 1450			5096
aac agc tcc aag tgc aag agc aag ccc cag att gct gcc ctg aag Asn Ser Ser Lys Cys Lys Ser Lys Pro Gln Ile Ala Ala Leu Lys 1455 1460 1465			5141
gag gag aca gag gag gaa gtg cag gac acc agg ctg tga gggccctgtg Glu Glu Thr Glu Glu Glu Val Gln Asp Thr Arg Leu 1470 1475 1480			5190
ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctcccctg tgccttcctt gaccctggaa			5250
gggtgccactc ccaactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcattgca ttgtctgagt			5310
agggtgtcatt ctattctggg ggggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa			5370
gacaatagca ggcattgcaga tcagcagttc aacctgttga tagtatgtac taagctctca			5430
tgtttaatgt actaagctct catgtttaat gaactaaacc ctcatggcta atgtactaag			5490
ctctcatggc taatgtacta agctctcatg ttctatgtac taagctctca tgtttgaaca			5550
ataaaattaa tataaatcag caacttaaat agcctctaag gttttaagtt ttataagaaa			5610
aaaaagaata tataaggctt ttaaaggttt taaggtttcc taggttatcc tgggtaccta			5670
gaaaaactca tccagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc			5730
atatttttga aaaagtcttt tctgtaatga aggagaaaac tcaccaggc agttccatag			5790
gatggcaaga tcttggtatc tgtctgcaat tccaactctt ccaacatcaa tacaacctat			5850
taatttcccc tcatcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgaccactga			5910
atctggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttgttcaa caggccagcc			5970
atttctctca tcatcaaaat cactggcatc aaccaaacca ttattcattc ttgattgggc			6030
ctgagccagt ctaaatactc tatcagagtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatggaatg			6090
caatcttctc aggaacactg ccagggcatc aacaatattt tcacctgaat caggatattc			6150
ttctaatacc tggaatgctg ttttcctgg gatggcagtg gtgagtaacc atgcatcatc			6210
aggagtctg ataaaatgct tgatggttgg aagaggcata aattcagtca gccagtttag			6270
tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacagaacct ttgccatggt tcagaaacaa			6330
ctctggggca tctggcttcc catacaatct atagattgtg gcacctgatt gcccaacatt			6390
atctctagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcttggcct			6450
ggagcaagag gtttctcttt gaatatggct catggatccc ctctatagtg gagttgtatt			6510

atactatgca gatatactat gccaatgttt aattgtcaa

6549

<210>3
 <211> 1480
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 3

Met Gln Arg Ser Pro Leu Glu Lys Ala Ser Val Val Ser Lys Leu Phe
 1 5 10 15
 Phe Ser Trp Thr Arg Pro Ile Leu Arg Lys Gly Tyr Arg Gln Arg Leu
 20 25 30
 Glu Leu Ser Asp Ile Tyr Gln Ile Pro Ser Val Asp Ser Ala Asp Asn
 35 40 45
 Leu Ser Glu Lys Leu Glu Arg Glu Trp Asp Arg Glu Leu Ala Ser Lys
 50 55 60
 Lys Asn Pro Lys Leu Ile Asn Ala Leu Arg Arg Cys Phe Phe Trp Arg
 65 70 75 80
 Phe Met Phe Tyr Gly Ile Phe Leu Tyr Leu Gly Glu Val Thr Lys Ala
 85 90 95
 Val Gln Pro Leu Leu Leu Gly Arg Ile Ile Ala Ser Tyr Asp Pro Asp
 100 105 110
 Asn Lys Glu Glu Arg Ser Ile Ala Ile Tyr Leu Gly Ile Gly Leu Cys
 115 120 125
 Leu Leu Phe Ile Val Arg Thr Leu Leu Leu His Pro Ala Ile Phe Gly
 130 135 140
 Leu His His Ile Gly Met Gln Met Arg Ile Ala Met Phe Ser Leu Ile
 145 150 155 160
 Tyr Lys Lys Thr Leu Lys Leu Ser Ser Arg Val Leu Asp Lys Ile Ser
 165 170 175
 Ile Gly Gln Leu Val Ser Leu Leu Ser Asn Asn Leu Asn Lys Phe Asp
 180 185 190
 Glu Gly Leu Ala Leu Ala His Phe Val Trp Ile Ala Pro Leu Gln Val
 195 200 205

ES 2 527 425 T3

Ala Leu Leu Met Gly Leu Ile Trp Glu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Phe
 210 215 220

Cys Gly Leu Gly Phe Leu Ile Val Leu Ala Leu Phe Gln Ala Gly Leu
 225 230 235 240

Gly Arg Met Met Met Lys Tyr Arg Asp Gln Arg Ala Gly Lys Ile Ser
 245 250 255

Glu Arg Leu Val Ile Thr Ser Glu Met Ile Glu Asn Ile Gln Ser Val
 260 265 270

Lys Ala Tyr Cys Trp Glu Glu Ala Met Glu Lys Met Ile Glu Asn Leu
 275 280 285

Arg Gln Thr Glu Leu Lys Leu Thr Arg Lys Ala Ala Tyr Val Arg Tyr
 290 295 300

Phe Asn Ser Ser Ala Phe Phe Phe Ser Gly Phe Phe Val Val Phe Leu
 305 310 315 320

Ser Val Leu Pro Tyr Ala Leu Ile Lys Gly Ile Ile Leu Arg Lys Ile
 325 330 335

Phe Thr Thr Ile Ser Phe Cys Ile Val Leu Arg Met Ala Val Thr Arg
 340 345 350

Gln Phe Pro Trp Ala Val Gln Thr Trp Tyr Asp Ser Leu Gly Ala Ile
 355 360 365

Asn Lys Ile Gln Asp Phe Leu Gln Lys Gln Glu Tyr Lys Thr Leu Glu
 370 375 380

Tyr Asn Leu Thr Thr Thr Glu Val Val Met Glu Asn Val Thr Ala Phe
 385 390 395 400

Trp Glu Glu Gly Phe Gly Glu Leu Phe Glu Lys Ala Lys Gln Asn Asn
 405 410 415

Asn Asn Arg Lys Thr Ser Asn Gly Asp Asp Ser Leu Phe Phe Ser Asn
 420 425 430

Phe Ser Leu Leu Gly Thr Pro Val Leu Lys Asp Ile Asn Phe Lys Ile
 435 440 445

Glu Arg Gly Gln Leu Leu Ala Val Ala Gly Ser Thr Gly Ala Gly Lys
 450 455 460

ES 2 527 425 T3

Thr Ser Leu Leu Met Met Ile Met Gly Glu Leu Glu Pro Ser Glu Gly
 465 470 475 480
 Lys Ile Lys His Ser Gly Arg Ile Ser Phe Cys Ser Gln Phe Ser Trp
 485 490 495
 Ile Met Pro Gly Thr Ile Lys Glu Asn Ile Ile Phe Gly Val Ser Tyr
 500 505 510
 Asp Glu Tyr Arg Tyr Arg Ser Val Ile Lys Ala Cys Gln Leu Glu Glu
 515 520 525
 Asp Ile Ser Lys Phe Ala Glu Lys Asp Asn Ile Val Leu Gly Glu Gly
 530 535 540
 Gly Ile Thr Leu Ser Gly Gly Gln Arg Ala Arg Ile Ser Leu Ala Arg
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Leu Leu Asp Ser Pro Phe Gly
 565 570 575
 Tyr Leu Asp Val Leu Thr Glu Lys Glu Ile Phe Glu Ser Cys Val Cys
 580 585 590
 Lys Leu Met Ala Asn Lys Thr Arg Ile Leu Val Thr Ser Lys Met Glu
 595 600 605
 His Leu Lys Lys Ala Asp Lys Ile Leu Ile Leu Asn Glu Gly Ser Ser
 610 615 620
 Tyr Phe Tyr Gly Thr Phe Ser Glu Leu Gln Asn Leu Gln Pro Asp Phe
 625 630 635 640
 Ser Ser Lys Leu Met Gly Cys Asp Ser Phe Asp Gln Phe Ser Ala Glu
 645 650 655
 Arg Arg Asn Ser Ile Leu Thr Glu Thr Leu His Arg Phe Ser Leu Glu
 660 665 670
 Gly Asp Ala Pro Val Ser Trp Thr Glu Thr Lys Lys Gln Ser Phe Lys
 675 680 685
 Gln Thr Gly Glu Phe Gly Glu Lys Arg Lys Asn Ser Ile Leu Asn Pro
 690 695 700
 Ile Asn Ser Ile Arg Lys Phe Ser Ile Val Gln Lys Thr Pro Leu Gln
 705 710 715 720
 Met Asn Gly Ile Glu Glu Asp Ser Asp Glu Pro Leu Glu Arg Arg Leu

ES 2 527 425 T3

				725						730						735
Ser	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Glu	Gln	Gly	Glu	Ala	Ile	Leu	Pro	Arg	Ile	
			740					745					750			
Ser	Val	Ile	Ser	Thr	Gly	Pro	Thr	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Arg	Gln	Ser	
		755					760					765				
Val	Leu	Asn	Leu	Met	Thr	His	Ser	Val	Asn	Gln	Gly	Gln	Asn	Ile	His	
	770					775					780					
Arg	Lys	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Arg	Lys	Val	Ser	Leu	Ala	Pro	Gln	Ala	
785					790					795					800	
Asn	Leu	Thr	Glu	Leu	Asp	Ile	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	
				805					810					815		
Gly	Leu	Glu	Ile	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Glu	Cys	
			820					825					830			
Leu	Phe	Asp	Asp	Met	Glu	Ser	Ile	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Trp	Asn	Thr	
		835					840					845				
Tyr	Leu	Arg	Tyr	Ile	Thr	Val	His	Lys	Ser	Leu	Ile	Phe	Val	Leu	Ile	
	850					855					860					
Trp	Cys	Leu	Val	Ile	Phe	Leu	Ala	Glu	Val	Ala	Ala	Ser	Leu	Val	Val	
865					870					875					880	
Leu	Trp	Leu	Leu	Gly	Asn	Thr	Pro	Leu	Gln	Asp	Lys	Gly	Asn	Ser	Thr	
				885					890					895		
His	Ser	Arg	Asn	Asn	Ser	Tyr	Ala	Val	Ile	Ile	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	
			900					905					910			
Tyr	Tyr	Val	Phe	Tyr	Ile	Tyr	Val	Gly	Val	Ala	Asp	Thr	Leu	Leu	Ala	
		915					920					925				
Met	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Leu	Pro	Leu	Val	His	Thr	Leu	Ile	Thr	Val	
	930					935					940					
Ser	Lys	Ile	Leu	His	His	Lys	Met	Leu	His	Ser	Val	Leu	Gln	Ala	Pro	
945					950					955					960	
Met	Ser	Thr	Leu	Asn	Thr	Leu	Lys	Ala	Gly	Gly	Ile	Leu	Asn	Arg	Phe	
				965					970					975		
Ser	Lys	Asp	Ile	Ala	Ile	Leu	Asp	Asp	Leu	Leu	Pro	Leu	Thr	Ile	Phe	
			980					985					990			

ES 2 527 425 T3

Asp Phe Ile Gln Leu Leu Leu Ile Val Ile Gly Ala Ile Ala Val Val
 995 1000 1005
 Ala Val Leu Gln Pro Tyr Ile Phe Val Ala Thr Val Pro Val Ile
 1010 1015 1020
 Val Ala Phe Ile Met Leu Arg Ala Tyr Phe Leu Gln Thr Ser Gln
 1025 1030 1035
 Gln Leu Lys Gln Leu Glu Ser Glu Gly Arg Ser Pro Ile Phe Thr
 1040 1045 1050
 His Leu Val Thr Ser Leu Lys Gly Leu Trp Thr Leu Arg Ala Phe
 1055 1060 1065
 Gly Arg Gln Pro Tyr Phe Glu Thr Leu Phe His Lys Ala Leu Asn
 1070 1075 1080
 Leu His Thr Ala Asn Trp Phe Leu Tyr Leu Ser Thr Leu Arg Trp
 1085 1090 1095
 Phe Gln Met Arg Ile Glu Met Ile Phe Val Ile Phe Phe Ile Ala
 1100 1105 1110
 Val Thr Phe Ile Ser Ile Leu Thr Thr Gly Glu Gly Glu Gly Arg
 1115 1120 1125
 Val Gly Ile Ile Leu Thr Leu Ala Met Asn Ile Met Ser Thr Leu
 1130 1135 1140
 Gln Trp Ala Val Asn Ser Ser Ile Asp Val Asp Ser Leu Met Arg
 1145 1150 1155
 Ser Val Ser Arg Val Phe Lys Phe Ile Asp Met Pro Thr Glu Gly
 1160 1165 1170
 Lys Pro Thr Lys Ser Thr Lys Pro Tyr Lys Asn Gly Gln Leu Ser
 1175 1180 1185
 Lys Val Met Ile Ile Glu Asn Ser His Val Lys Lys Asp Asp Ile
 1190 1195 1200
 Trp Pro Ser Gly Gly Gln Met Thr Val Lys Asp Leu Thr Ala Lys
 1205 1210 1215
 Tyr Thr Glu Gly Gly Asn Ala Ile Leu Glu Asn Ile Ser Phe Ser
 1220 1225 1230

ES 2 527 425 T3

Ile Ser Pro Gly Gln Arg Val Gly Leu Leu Gly Arg Thr Gly Ser
 1235 1240 1245

Gly Lys Ser Thr Leu Leu Ser Ala Phe Leu Arg Leu Leu Asn Thr
 1250 1255 1260

Glu Gly Glu Ile Gln Ile Asp Gly Val Ser Trp Asp Ser Ile Thr
 1265 1270 1275

Leu Gln Gln Trp Arg Lys Ala Phe Gly Val Ile Pro Gln Lys Val
 1280 1285 1290

Phe Ile Phe Ser Gly Thr Phe Arg Lys Asn Leu Asp Pro Tyr Glu
 1295 1300 1305

Gln Trp Ser Asp Gln Glu Ile Trp Lys Val Ala Asp Glu Val Gly
 1310 1315 1320

Leu Arg Ser Val Ile Glu Gln Phe Pro Gly Lys Leu Asp Phe Val
 1325 1330 1335

Leu Val Asp Gly Gly Cys Val Leu Ser His Gly His Lys Gln Leu
 1340 1345 1350

Met Cys Leu Ala Arg Ser Val Leu Ser Lys Ala Lys Ile Leu Leu
 1355 1360 1365

Leu Asp Glu Pro Ser Ala His Leu Asp Pro Val Thr Tyr Gln Ile
 1370 1375 1380

Ile Arg Arg Thr Leu Lys Gln Ala Phe Ala Asp Cys Thr Val Ile
 1385 1390 1395

Leu Cys Glu His Arg Ile Glu Ala Met Leu Glu Cys Gln Gln Phe
 1400 1405 1410

Leu Val Ile Glu Glu Asn Lys Val Arg Gln Tyr Asp Ser Ile Gln
 1415 1420 1425

Lys Leu Leu Asn Glu Arg Ser Leu Phe Arg Gln Ala Ile Ser Pro
 1430 1435 1440

Ser Asp Arg Val Lys Leu Phe Pro His Arg Asn Ser Ser Lys Cys
 1445 1450 1455

Lys Ser Lys Pro Gln Ile Ala Ala Leu Lys Glu Glu Thr Glu Glu
 1460 1465 1470

Glu Val Gln Asp Thr Arg Leu
 1475 1480

<210>4
 <211> 3759
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> construcción de plásmido pGM144
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> sitio de restricción Bgl II
 10
 <220>
 <221 > potenciador
 <222> (7)..(308)
 <223> potenciador CMV humano
 15
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (309)..(314)
 <223> sitio de restricción EcoRI
 20
 <220>
 <221 > promotor
 <222> (315)..(538)
 <223> promotor del factor de alargamiento humano 1 α
 25
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (329)..(334)
 <223> sitio de restricción Sph I
 30
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (539)..(569)
 <223> Exón
 35
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (570)..(709)
 <223> Intrón
 40
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (710)..(727)
 <223> Exón
 45
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (728)..(733)
 <223> sitio de restricción NheI
 50
 <220>
 <221 > misc_feature
 <222> (733)..(737)
 <223> secuencia Kozak
 55
 <220>
 <221 > CDS
 <222> (738)..(2390)
 <223> gen indicador de la luciferasa
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2391)..(2396)
 <223> sitio de enzima de restricción Apa I
 65

ES 2 527 425 T3

<220>
 <221 > polyA_signal
 <222> (2396)..(2597)
 <223> secuencia de poliadenilación del gen de la hormona del crecimiento bovina
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2592)..(2597)
 <223> sitio de la enzima de restricción Sph I de poly A
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2598)..(2598)
 <223> A incluido para evitar el dinucleótido cpg
 15
 <220>
 <221> rep_origin
 <222> (2599)..(2870)
 <223> origen de replicación R6K
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2871)..(2871)
 <223> A incluido para evitar el dinucleótido cpg
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2872)..(2877)
 <223> sitio de restricción KpnI
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2878)..(3693)
 <223> marcador de resistencia a la kanamicina
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3694)..(3699)
 <223> sitio de restricción BamHI
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3700)..(3705)
 <223> secuencia de unión al ribosoma de Shine Delgarno
 45
 <220>
 <221 > promotor
 <222> (3706)..(3759)
 <223> promotor bacteriano EM7
 50
 <400>4
 agatctgtta cataacttat ggtaaatggc ctgcctggct gactgcccaa tgaccctgc 60
 ccaatgatgt caataatgat gtatgttccc atgtaatgcc aatagggact ttccattgat 120
 gtcaatgggt ggagtattta tggttaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat 180

ES 2 527 425 T3

gcc	aag	tat	g	ccc	ctt	atg	tca	aat	gga	ctg	cct	gag	att	atg	ccca	240	
gtac	atg	gacc	ttat	ggg	act	ttc	tact	ttg	gcag	tac	atc	tat	gtat	ttag	tcatt	gctat	300
tacc	atg	ggga	attc	act	tag	ggaga	aag	agc	atg	cct	tgag	tgcc	cct	cag	tg	ggg	360
caga	gag	gcac	atgg	cccc	aaca	gtcc	cct	gaga	agtt	gggg	ggg	agg	ggg	tg	g	g	420
gtgc	ctag	agag	aagg	tg	ggg	taaac	tg	gaa	agt	g	gtg	gt	gta	ct	ggc	ctcc	480
cttt	tcccc	agg	tg	ggg	ggg	ggg	aga	acc	atat	ata	agt	gcag	tag	tct	ctgt	gaac	540
gctt	ctgc	ct	tct	ccc	ctct	gtg	ag	ttt	gg	taag	tact	g	act	gt	ctat	cct	600
gg	tg	ggc	agg	ggg	gca	gtg	cag	gaaa	agt	gg	ca	cta	tga	acc	ctg	c	660
atgc	at	ctag	aca	att	gtac	taac	ctt	ctt	ctt	ctt	ctc	tct	gac	cag	ttg	gt	720
gtag	ctt	gct	agcc	acc	atg	gag	gat	gct	aag	aac	atc	aag	aag	ggg	cct		770
					Met	Glu	Asp	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Pro		
					1				5					10			
gcc	ccc	ttc	tac	ccc	ctg	gag	gat	ggc	aca	gct	ggg	gag	cag	ctg	cac	818	
Ala	Pro	Phe	Tyr	Pro	Leu	Glu	Asp	Gly	Thr	Ala	Gly	Glu	Gln	Leu	His		
			15					20					25				
aag	gct	atg	aag	aga	tat	gcc	ctg	gtg	cct	ggc	act	att	gcc	ttc	aca	866	
Lys	Ala	Met	Lys	Arg	Tyr	Ala	Leu	Val	Pro	Gly	Thr	Ile	Ala	Phe	Thr		
		30					35					40					
gat	gct	cac	att	gaa	gtg	gac	atc	acc	tat	gct	gag	tac	ttt	gag	atg	914	
Asp	Ala	His	Ile	Glu	Val	Asp	Ile	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Phe	Glu	Met		
	45					50					55						
tca	gtg	agg	ctg	gct	gag	gct	atg	aaa	aga	tat	ggg	ctg	aac	act	aat	962	
Ser	Val	Arg	Leu	Ala	Glu	Ala	Met	Lys	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asn	Thr	Asn		
	60				65					70					75		
cac	agg	att	gtg	gtg	tgt	tca	gag	aac	tca	ctg	cag	ttc	ttc	atg	cct	1010	
His	Arg	Ile	Val	Val	Cys	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu	Gln	Phe	Phe	Met	Pro		
				80					85					90			
gtg	ctg	gga	gcc	ctg	ttc	att	gga	gtg	gct	gtg	gcc	cct	gct	aat	gac	1058	
Val	Leu	Gly	Ala	Leu	Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp		
			95				100					105					
atc	tac	aat	gag	agg	gag	ctg	ctg	aac	tct	atg	ggc	atc	agt	cag	cct	1106	
Ile	Tyr	Asn	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Gly	Ile	Ser	Gln	Pro		
		110					115					120					
aca	gtg	gtg	ttt	gtg	tct	aag	aag	ggc	ctg	cag	aaa	atc	ctg	aat	gtg	1154	
Thr	Val	Val	Phe	Val	Ser	Lys	Lys	Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu	Asn	Val		
	125					130					135						
cag	aag	aag	ctg	cct	atc	att	cag	aaa	atc	atc	atc	atg	gac	tct	aag	1202	
Gln	Lys	Lys	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Lys		
	140				145					150					155		
aca	gac	tat	cag	ggc	ttt	cag	tct	atg	tac	acc	ttt	gtg	act	agt	cac	1250	
Thr	Asp	Tyr	Gln	Gly	Phe	Gln	Ser	Met	Tyr	Thr	Phe	Val	Thr	Ser	His		
				160					165					170			
ctg	ccc	cct	ggc	ttc	aat	gag	tat	gac	ttt	gtg	cct	gag	tca	ttt	gac	1298	
Leu	Pro	Pro	Gly	Phe	Asn	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp		
			175					180					185				

ES 2 527 425 T3

agg Arg	gac Asp	aag Lys 190	act Thr	att Ile	gcc Ala	ctg Leu	atc Ile 195	atg Met	aac Asn	tca Ser	tca Ser	ggc Gly 200	tct Ser	aca Thr	ggc Gly	1346
ctg Leu	cct Pro 205	aag Lys	gga Gly	gtg Val	gcc Ala	ctg Leu 210	cct Pro	cac His	agg Arg	aca Thr	gcc Ala 215	tgt Cys	gtg Val	aga Arg	ttc Phe	1394
agt Ser 220	cat His	gct Ala	agg Arg	gac Asp	cct Pro 225	atc Ile	ttt Phe	ggc Gly	aat Asn	cag Gln 230	atc Ile	atc Ile	cct Pro	gac Asp	aca Thr 235	1442
gct Ala	atc Ile	ctg Leu	tca Ser	gtg Val 240	gtg Val	ccc Pro	ttt Phe	cat His	cat His 245	ggc Gly	ttt Phe	ggc Gly	atg Met	ttc Phe 250	act Thr	1490
acc Thr	ctg Leu	ggc Gly	tac Tyr 255	ctg Leu	atc Ile	tgt Cys	ggc Gly	ttc Phe 260	aga Arg	gtg Val	gtg Val	ctg Leu	atg Met 265	tac Tyr	aga Arg	1538
ttt Phe	gag Glu	gag Glu 270	gag Glu	ctg Leu	ttc Phe	ctg Leu	aga Arg 275	tca Ser	ctg Leu	cag Gln	gac Asp	tac Tyr 280	aaa Lys	att Ile	cag Gln	1586
tca Ser	gcc Ala 285	ctg Leu	ctg Leu	gtg Val	cct Pro	acc Thr 290	ctg Leu	ttc Phe	agc Ser	ttc Phe	ttt Phe 295	gct Ala	aag Lys	tct Ser	acc Thr	1634
ctg Leu 300	att Ile	gac Asp	aag Lys	tat Tyr	gac Asp 305	ctg Leu	tct Ser	aac Asn	ctg Leu	cat His 310	gag Glu	att Ile	gcc Ala	tca Ser	ggg Gly 315	1682
gga Gly	gcc Ala	ccc Pro	ctg Leu	tct Ser 320	aag Lys	gaa Glu	gtg Val	ggg Gly	gaa Glu 325	gct Ala	gtg Val	gct Ala	aag Lys	aga Arg 330	ttt Phe	1730
cac His	ctg Leu	cct Pro	ggc Gly 335	atc Ile	agg Arg	cag Gln	ggc Gly	tat Tyr 340	ggc Gly	ctg Leu	aca Thr	gag Glu	act Thr 345	acc Thr	tca Ser	1778
gct Ala	att Ile	ctg Leu 350	atc Ile	acc Thr	cct Pro	gag Glu	ggg Gly 355	gat Asp	gac Asp	aag Lys	cct Pro	ggg Gly 360	gct Ala	gtg Val	ggc Gly	1826
aaa Lys	gtg Val 365	gtg Val	cct Pro	ttc Phe	ttt Phe	gag Glu 370	gct Ala	aaa Lys	gtg Val	gtg Val	gac Asp 375	ctg Leu	gac Asp	aca Thr	ggc Gly	1874
aag Lys 380	acc Thr	ctg Leu	gga Gly	gtg Val	aat Asn 385	cag Gln	agg Arg	ggg Gly	gag Glu	ctg Leu 390	tgt Cys	gtg Val	aga Arg	ggc Gly	cct Pro 395	1922
atg Met	atc Ile	atg Met	tca Ser	ggc Gly 400	tat Tyr	gtg Val	aac Asn	aac Asn	cct Pro 405	gag Glu	gct Ala	act Thr	aat Asn	gcc Ala 410	ctg Leu	1970
att Ile	gat Asp	aag Lys	gat Asp 415	ggc Gly	tgg Trp	ctg Leu	cac His	tca Ser 420	ggg Gly	gac Asp	att Ile	gcc Ala	tac Tyr 425	tgg Trp	gat Asp	2018
gag Glu	gat Asp	gag Glu 430	cac His	ttc Phe	ttc Phe	att Ile	gtg Val 435	gac Asp	agg Arg	ctg Leu	aag Lys	tca Ser 440	ctc Leu	atc Ile	aag Lys	2066

ES 2 527 425 T3

tac aag ggc tat caa gtg gcc cca gct gag tta gag tca atc tta ctt	2114
Tyr Lys Gly Tyr Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu	
445 450 455	
cag cac cct aac atc ttt gat gct gga gtg gca ggc tta cct gat gat	2162
Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp	
460 465 470 475	
gat gct ggg gag tta cct gct gct gtg gtg gtg tta gag cat ggc aag	2210
Asp Ala Gly Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys	
480 485 490	
act atg aca gag aaa gag att gtg gat tat gtg gct agt caa gtc act	2258
Thr Met Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr	
495 500 505	
aca gct aag aag ctc agg ggg gga gtg gtc ttt gtg gat gaa gtg cct	2306
Thr Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro	
510 515 520	
aag ggc ctc aca ggc aag tta gat gct agg aag atc agg gag atc ctc	2354
Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu	
525 530 535	
atc aag gct aag aag ggg ggc aag att gct gtt taa gggccctgtg	2400
Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ile Ala Val	
540 545 550	
ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc cctcccctg tgccttcctt gaccctggaa	2460
ggtgccactc cactgtcct ttctaataa aatgaggaaa ttgcattgca ttgtctgagt	2520
aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa	2580
gacaatagca ggcattgcaga tcagcagttc aacctgttga tagtatgtac taagctctca	2640
tgtttaatgt actaagctct catgtttaat gaactaaacc ctcatggcta atgtactaag	2700
ctctcatggc taatgtacta agctctcatg ttcatgtac taagctctca tgtttgaaca	2760
ataaaattaa tataaatcag caacttaaat agcctctaag gttttaagtt ttataagaaa	2820
aaaaagaata tataaggctt ttaaaggttt taaggtttcc taggttatcc tggtaacctta	2880
gaaaaactca tccagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc	2940
atatttttga aaaagtcttt tctgtaatga aggagaaaac tcaccaggc agttccatag	3000
gatggcaaga tcttggtatc tgtctgcaat tccaactctt ccaacatcaa tacaacctat	3060
taatttccc tcatcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgaccactga	3120
atctggtgag aatggcaaaa gcttatgcat ttctttccag acttgttcaa caggccagcc	3180
atctctctca tcatcaaaat cactggcatc aaccaacca ttattcattc ttgattgggc	3240
ctgagccagt ctaaatactc tatcagagtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatggaatg	3300
caatcttctc aggaacactg ccagggcatc aacaatattt tcacctgaat caggatattc	3360
ttctaatacc tggaatgctg tttccctgg gatggcagtg gtgagtaacc atgcatcatc	3420
aggagttctg ataaaatgct tgatggttgg aagaggcata aattcagtca gccagtttag	3480
tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacagaacct ttgccatggt tcagaaacaa	3540

ES 2 527 425 T3

ctctggggca tctggcttcc catacaatct atagattgtg gcacctgatt gcccaacatt 3600
atctctagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcttggcct 3660
ggagcaagag gtttctcttt gaatatggct catggatccc ctctatagt gagttgtatt 3720
atactatgca gatatactat gccaatgttt aattgtcaa 3759

<210>5
<211> 550
<212> PRT
5 <213> secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética

10 <400> 5

ES 2 527 425 T3

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
 1 5 10 15
 Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
 20 25 30
 Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu
 35 40 45
 Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala
 50 55 60
 Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val
 65 70 75 80
 Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu
 85 90 95
 Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg
 100 105 110
 Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val
 115 120 125
 Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro
 130 135 140
 Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly
 145 150 155 160
 Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
 165 170 175
 Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile

ES 2 527 425 T3

			180					185					190		
Ala	Leu	Ile	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Lys	Gly	Val
		195					200					205			
Ala	Leu	Pro	His	Arg	Thr	Ala	Cys	Val	Arg	Phe	Ser	His	Ala	Arg	Asp
	210					215					220				
Pro	Ile	Phe	Gly	Asn	Gln	Ile	Ile	Pro	Asp	Thr	Ala	Ile	Leu	Ser	Val
225					230					235					240
Val	Pro	Phe	His	His	Gly	Phe	Gly	Met	Phe	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Leu
				245					250					255	
Ile	Cys	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Met	Tyr	Arg	Phe	Glu	Glu	Glu	Leu
			260					265					270		
Phe	Leu	Arg	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Ile	Gln	Ser	Ala	Leu	Leu	Val
		275					280					285			
Pro	Thr	Leu	Phe	Ser	Phe	Phe	Ala	Lys	Ser	Thr	Leu	Ile	Asp	Lys	Tyr
	290					295					300				
Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Glu	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Ser
305					310					315					320
Lys	Glu	Val	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Arg	Phe	His	Leu	Pro	Gly	Ile
				325					330					335	
Arg	Gln	Gly	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Ala	Ile	Leu	Ile	Thr
			340					345					350		
Pro	Glu	Gly	Asp	Asp	Lys	Pro	Gly	Ala	Val	Gly	Lys	Val	Val	Pro	Phe
		355					360					365			
Phe	Glu	Ala	Lys	Val	Val	Asp	Leu	Asp	Thr	Gly	Lys	Thr	Leu	Gly	Val
	370					375					380				
Asn	Gln	Arg	Gly	Glu	Leu	Cys	Val	Arg	Gly	Pro	Met	Ile	Met	Ser	Gly
385					390					395					400
Tyr	Val	Asn	Asn	Pro	Glu	Ala	Thr	Asn	Ala	Leu	Ile	Asp	Lys	Asp	Gly
				405					410					415	
Trp	Leu	His	Ser	Gly	Asp	Ile	Ala	Tyr	Trp	Asp	Glu	Asp	Glu	His	Phe
			420					425					430		
Phe	Ile	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Ser	Leu	Ile	Lys	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Gln
		435					440					445			

ES 2 527 425 T3

Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Ala Gly Glu Leu
 465 470 475 480

Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
 485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
 500 505 510

Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
 530 535 540

Gly Gly Lys Ile Ala Val
 545 550

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia potenciadora y promotora unida operativamente a una secuencia para la expresión, en la que la secuencia potenciadora y promotora comprende:
- (i) una secuencia de los nucleótidos 7 a 538 de SEC ID N° 1; o
 - (ii) una secuencia de al menos 200 nucleótidos de (i); o
 - (iii) una secuencia de al menos un 80 % de identidad de secuencia con (i),
- 10 en la que la secuencia potenciadora y promotora comprende menos de 15 dinucleótidos CpG.
2. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 1, que es una construcción plasmídica.
- 15 3. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la secuencia potenciadora y promotora no comprende ningún dinucleótido CpG.
4. Una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la construcción no comprende ningún dinucleótido CpG.
- 20 5. Una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la secuencia para la expresión codifica un polipéptido terapéutico.
6. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la secuencia que se va a expresar codifica un polipéptido CFTR, donde la construcción comprende:
- (i) la secuencia de SEC ID N° 2 o la secuencia de SEC ID N° 2 en la que el nucleótido 2595 es C y/o el nucleótido 3234 y 3236 son T y C respectivamente; o
 - (ii) una construcción con al menos un 70 % de identidad de secuencia con (i).
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
8. Una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o cirugía, o para su uso como un medicamento.
- 35 9. Uso de una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno genético, una afección crónica, cáncer, alergia, autoinmunidad, infección o un cáncer.
- 40 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la enfermedad que se va a tratar es un trastorno de las vías respiratorias.
11. Un método no terapéutico de expresión de una secuencia en un sujeto animal no humano, método que comprende administrar una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la secuencia potenciadora y promotora está unida operativamente a una secuencia no terapéutica para la expresión.
- 45 12. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia o el complemento de una secuencia, seleccionado del grupo que comprende:
- (i) la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 738 a 5180 de SEC ID N° 2; y
 - (ii) la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 738 a 5180 de SEC ID N° 2 en la que el nucleótido 2595 es modificado de A a C y/o los nucleótidos 3234 y 3236 son modificados de C a T y de G a C, respectivamente.
- 50 13. Un método *in vitro* o *ex vivo* de expresión de un gen en una célula, un tejido o un órgano, método que comprende introducir una construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en dichas células, tejido u órgano.
- 55 14. Una secuencia potenciadora y promotora aislada, siendo la secuencia potenciadora y promotora como se ha definido en la reivindicación 1 o 4.
- 60 15. Una construcción que comprende una secuencia potenciadora y promotora unida operativamente a un sitio de restricción, en la que:
- (i) la secuencia potenciadora y promotora es como se ha definido en la reivindicación 1 o 3; y
 - (ii) la inserción de las secuencias de codificación en el sitio de restricción generará su unión operativa con la secuencia potenciadora y promotora.
- 65

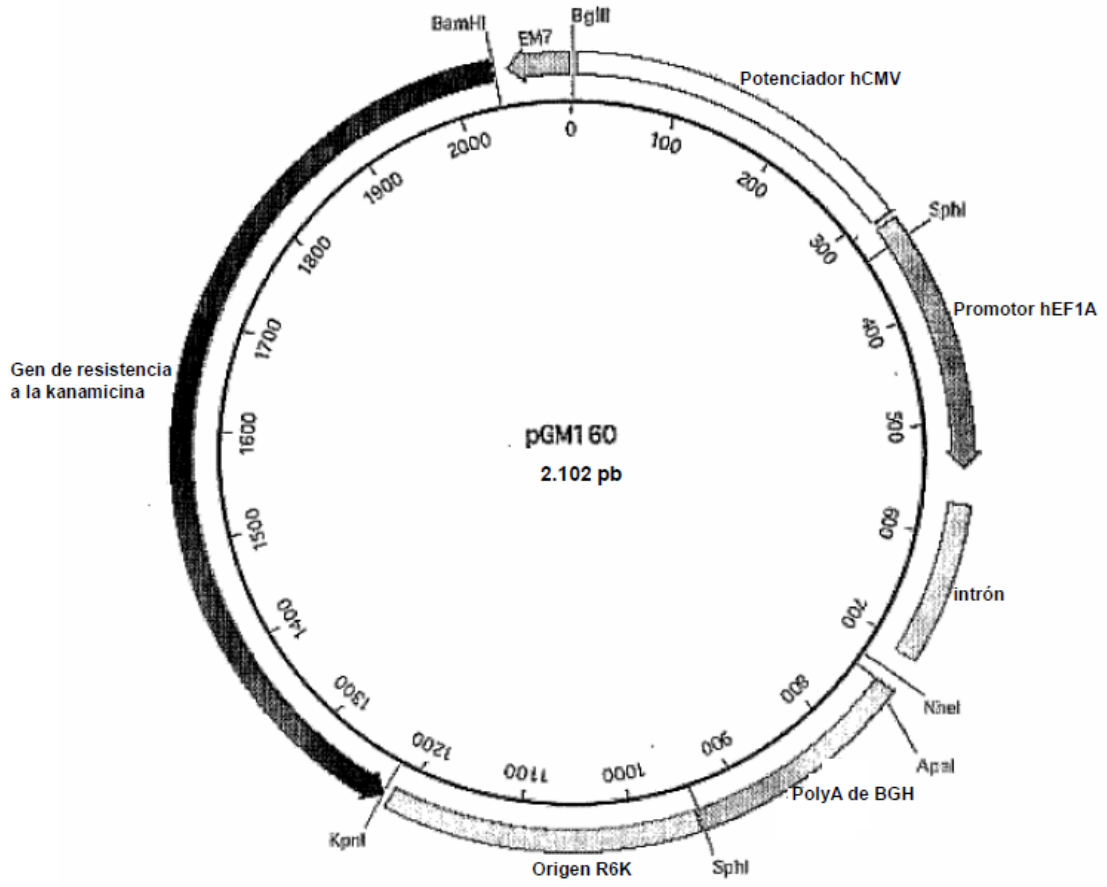


Figura 1

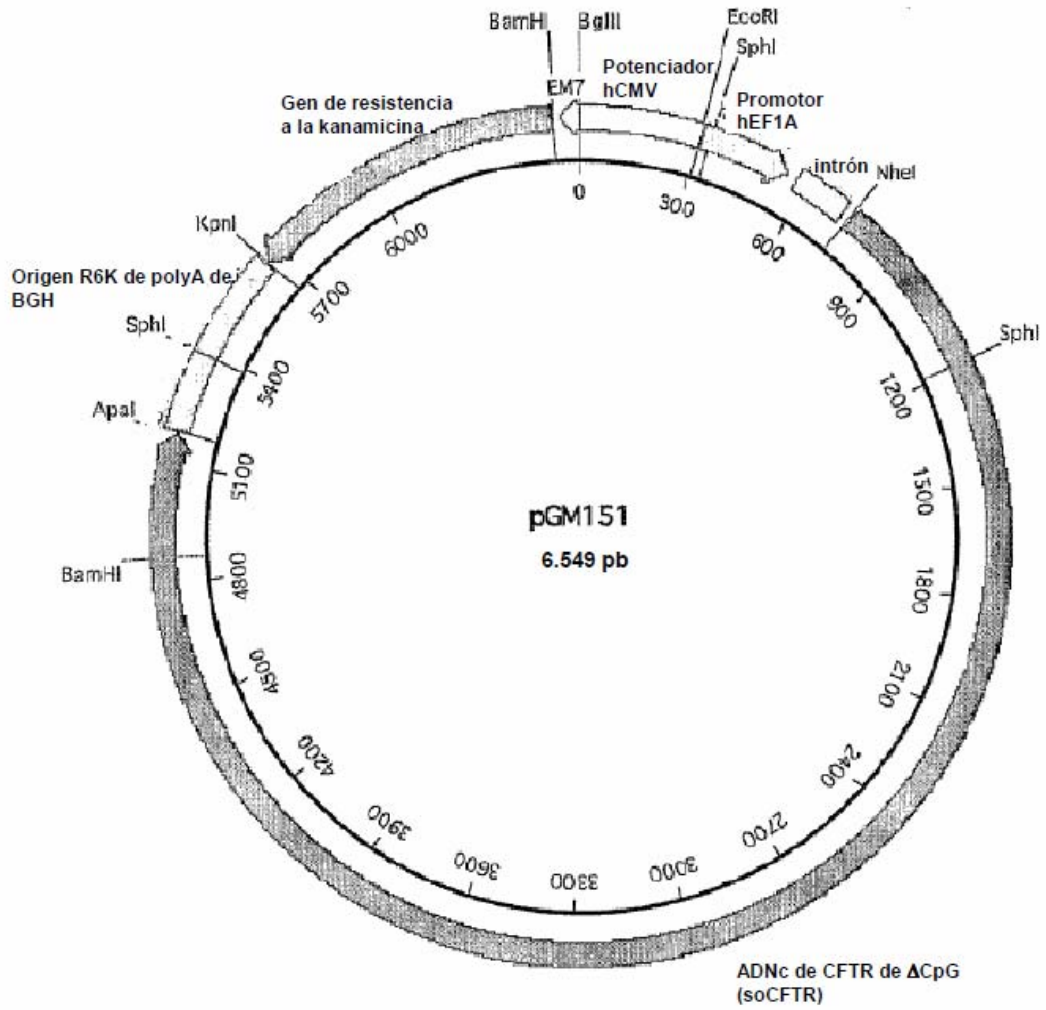


Figura 2

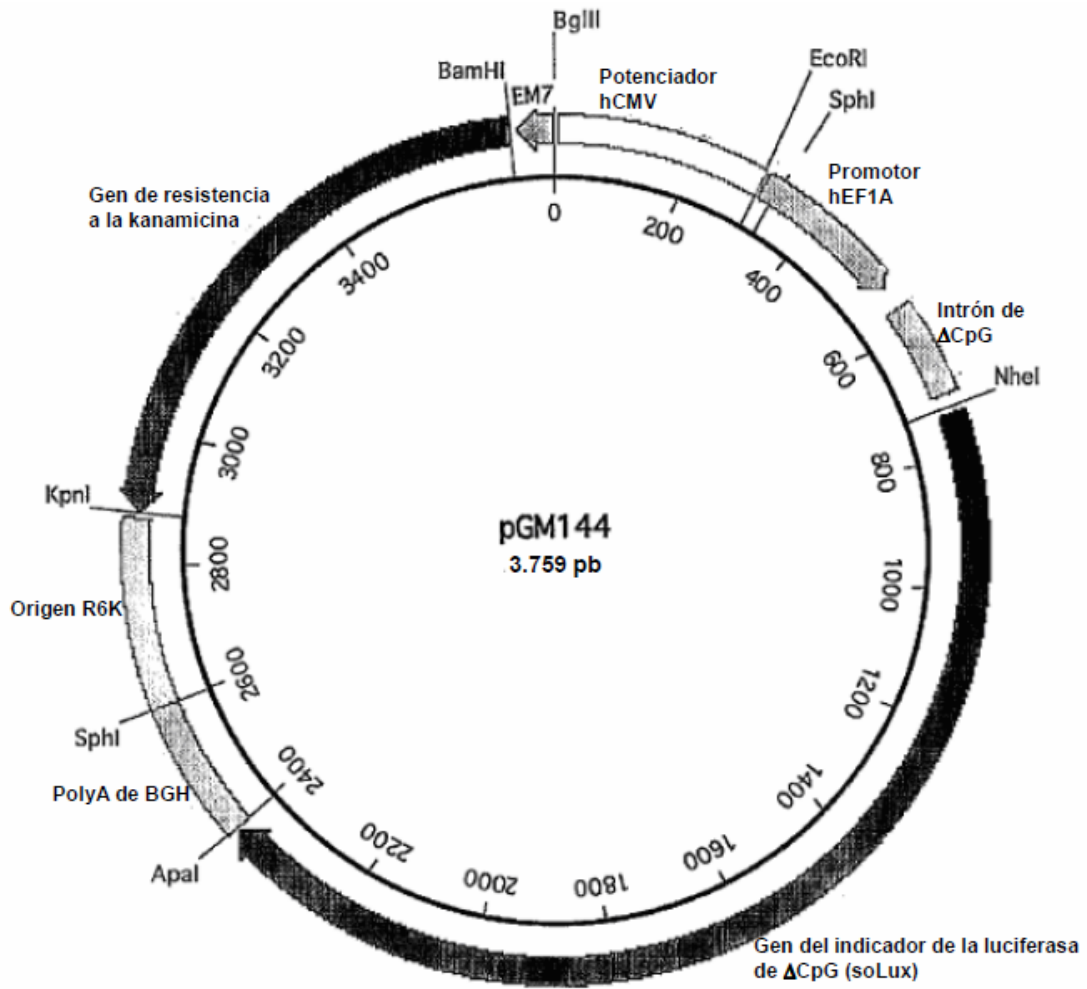


Figura 3

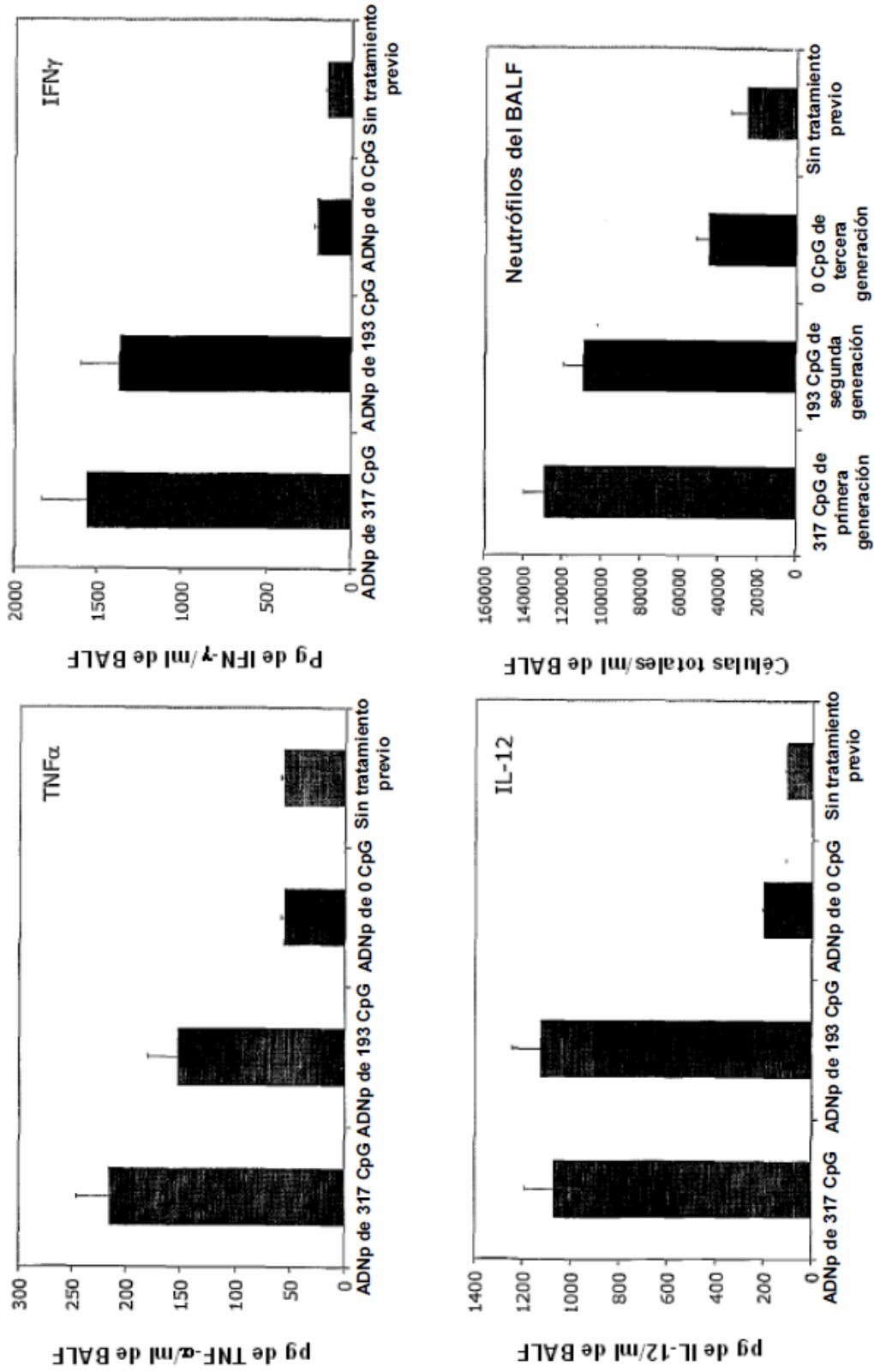


Figura 4a

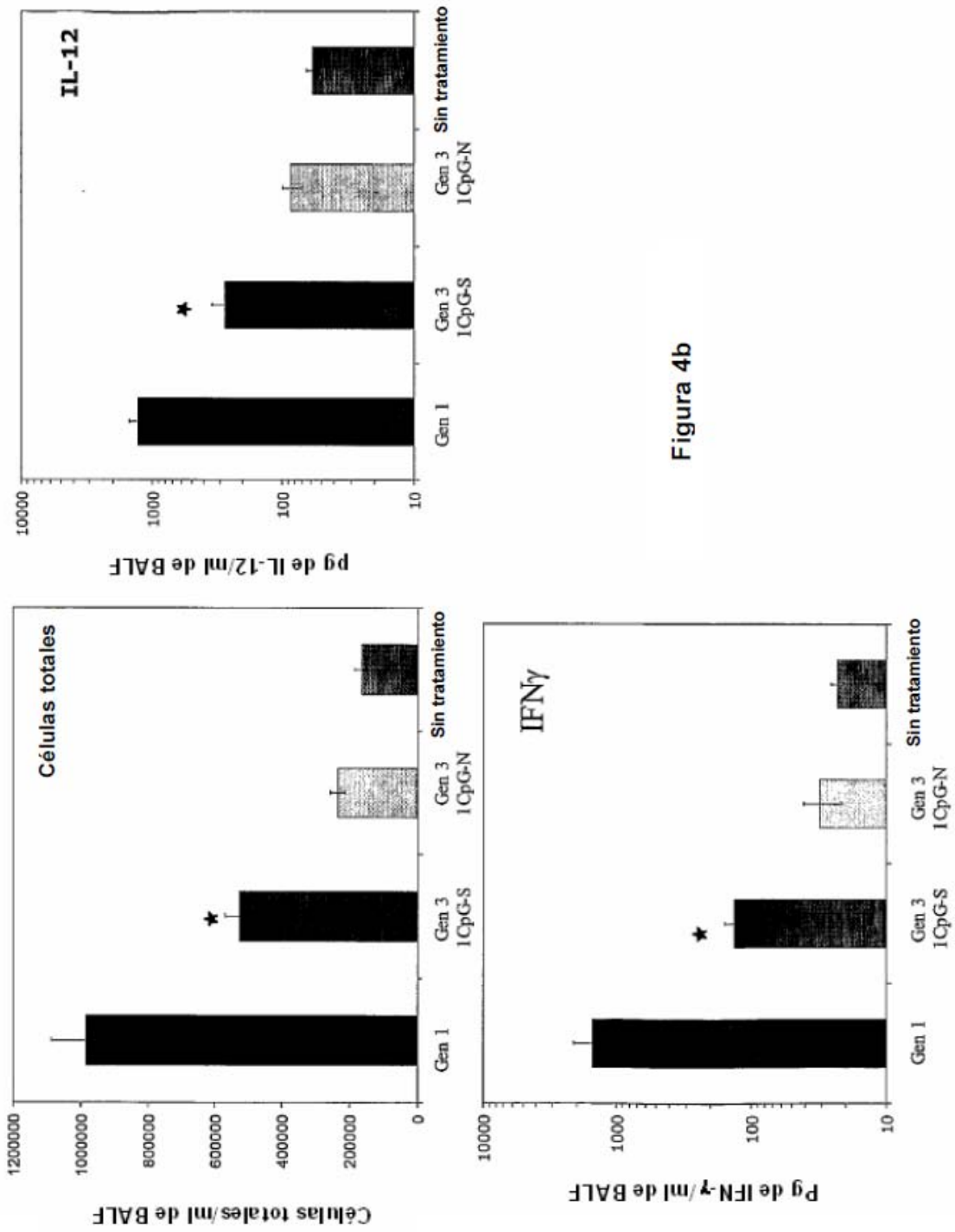


Figura 4b

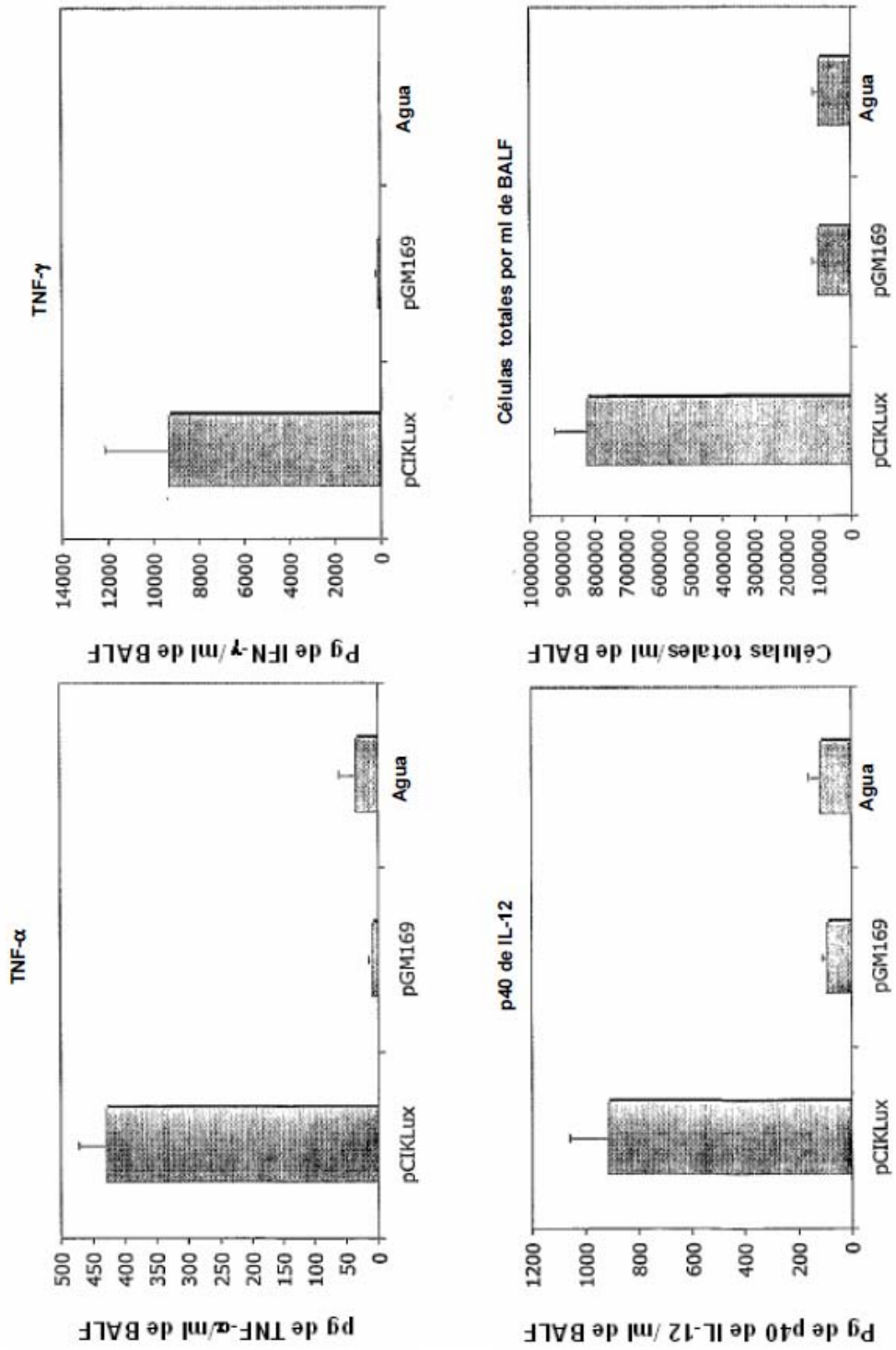


Figura 4c

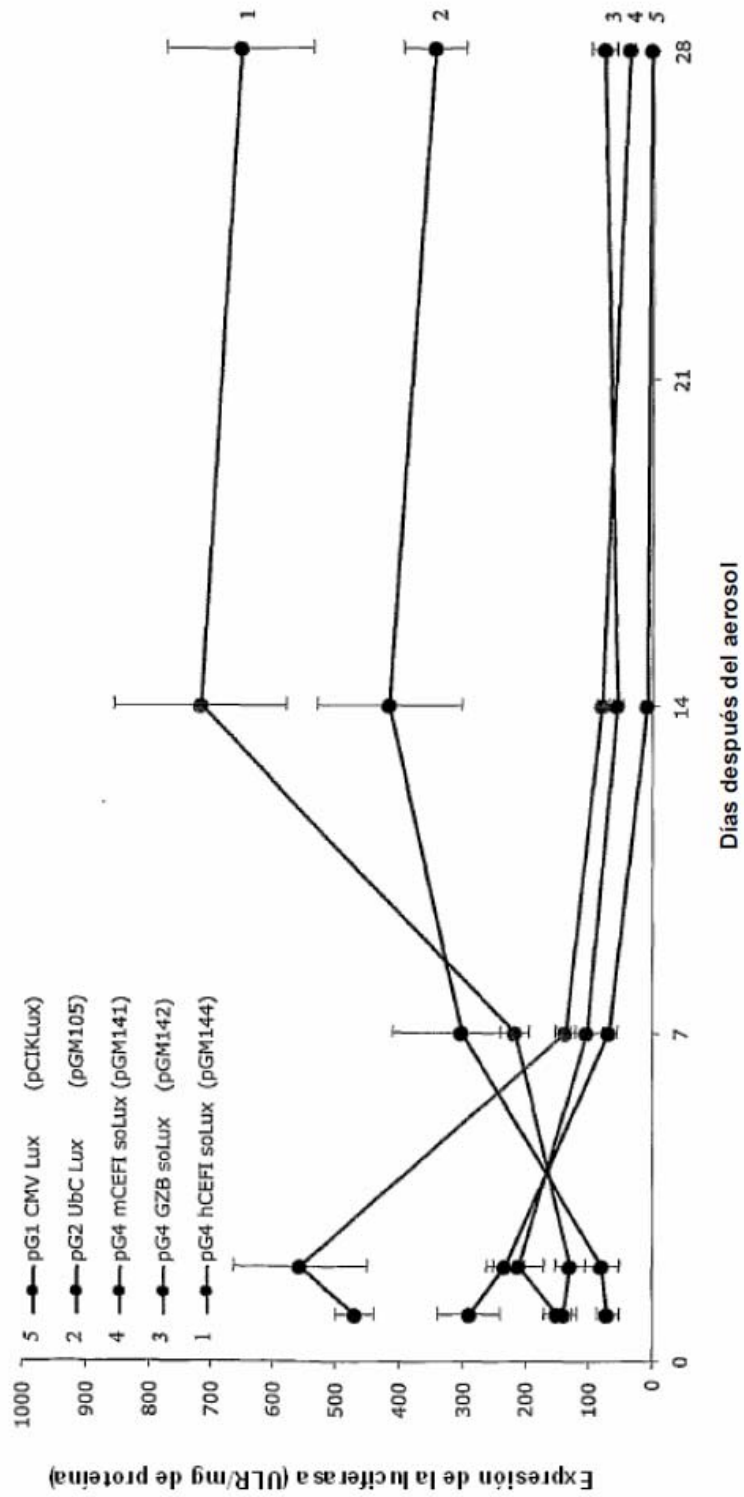


Figura 5

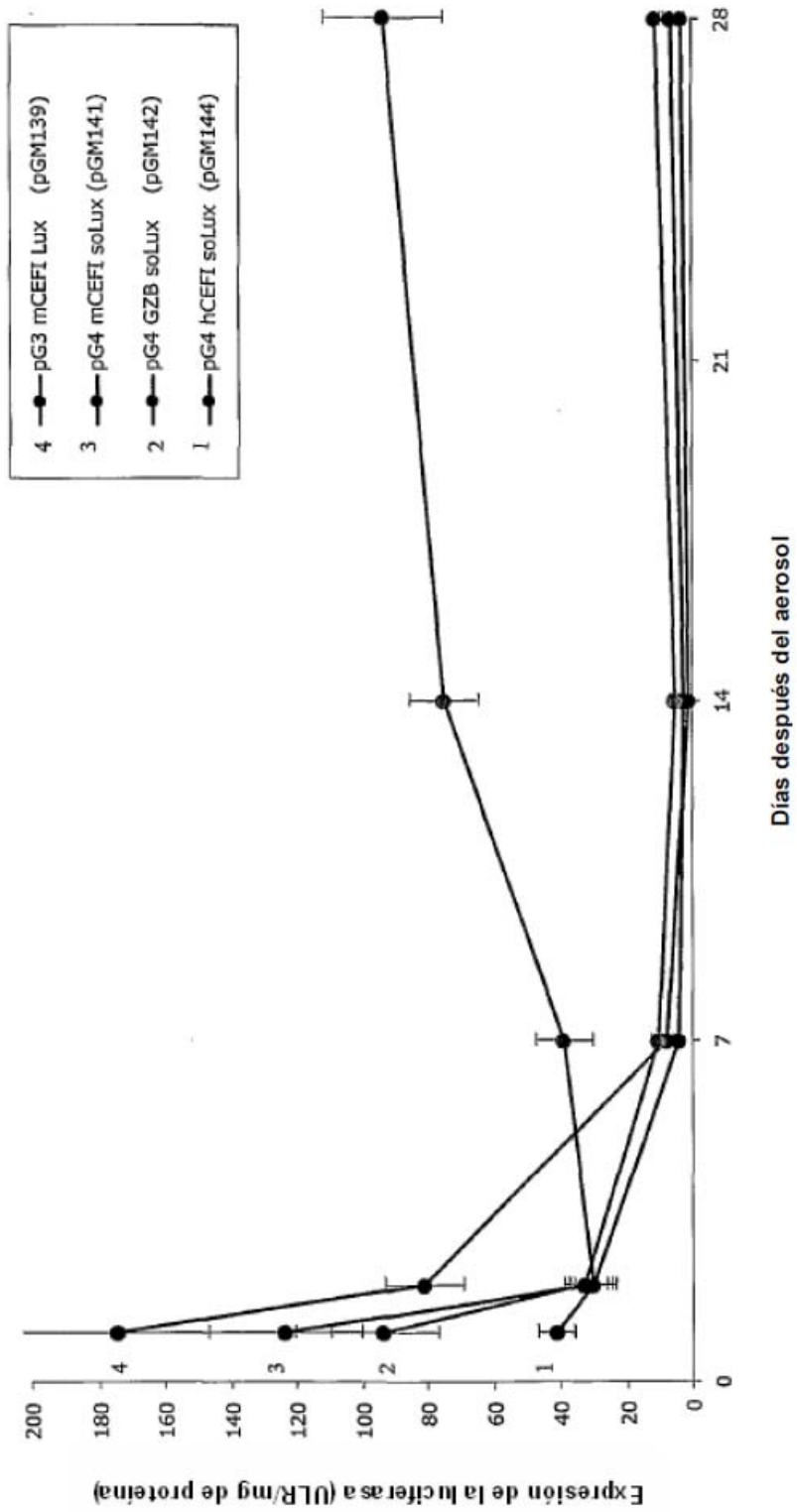


Figura 6

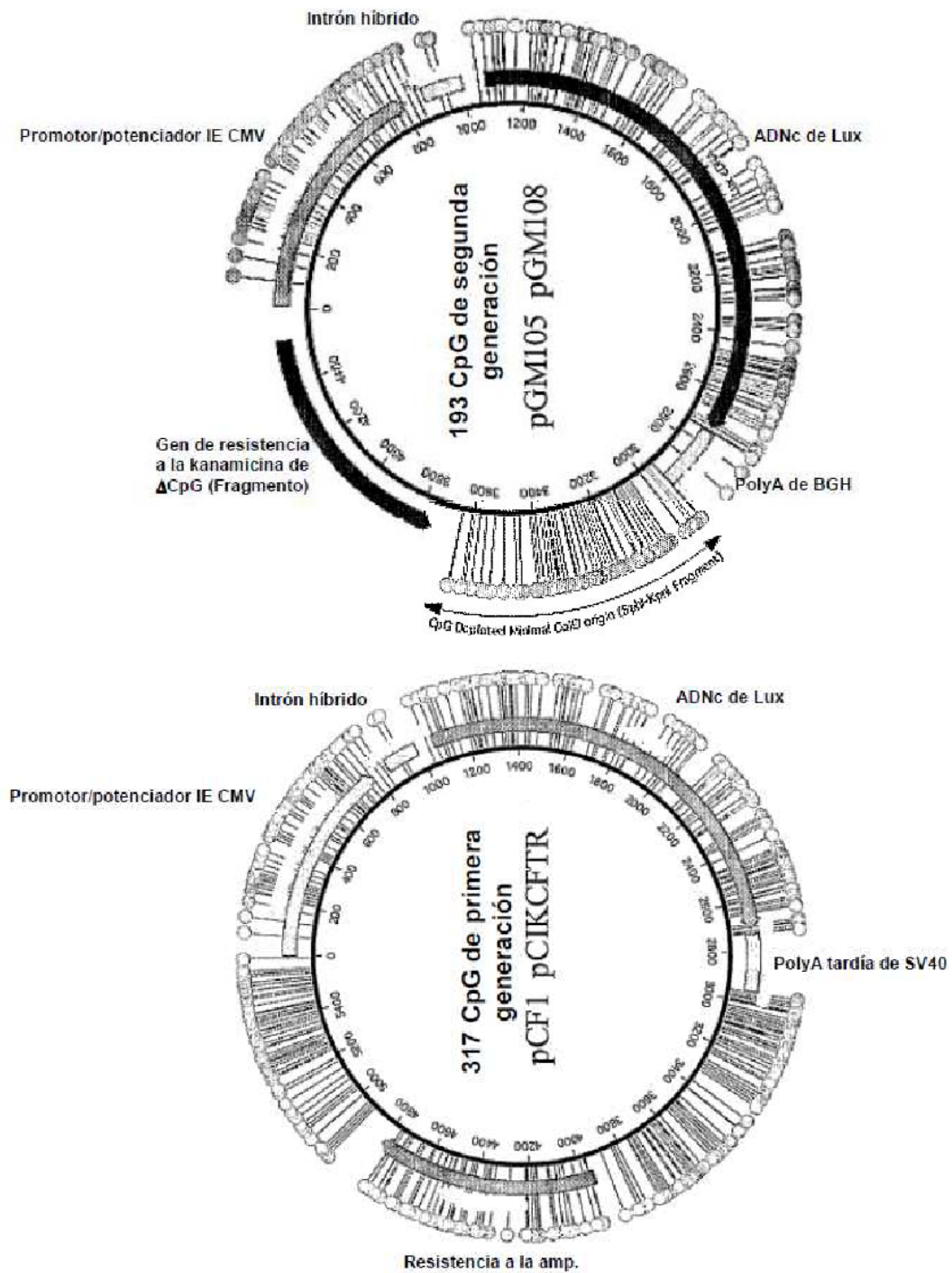


Figura 7a

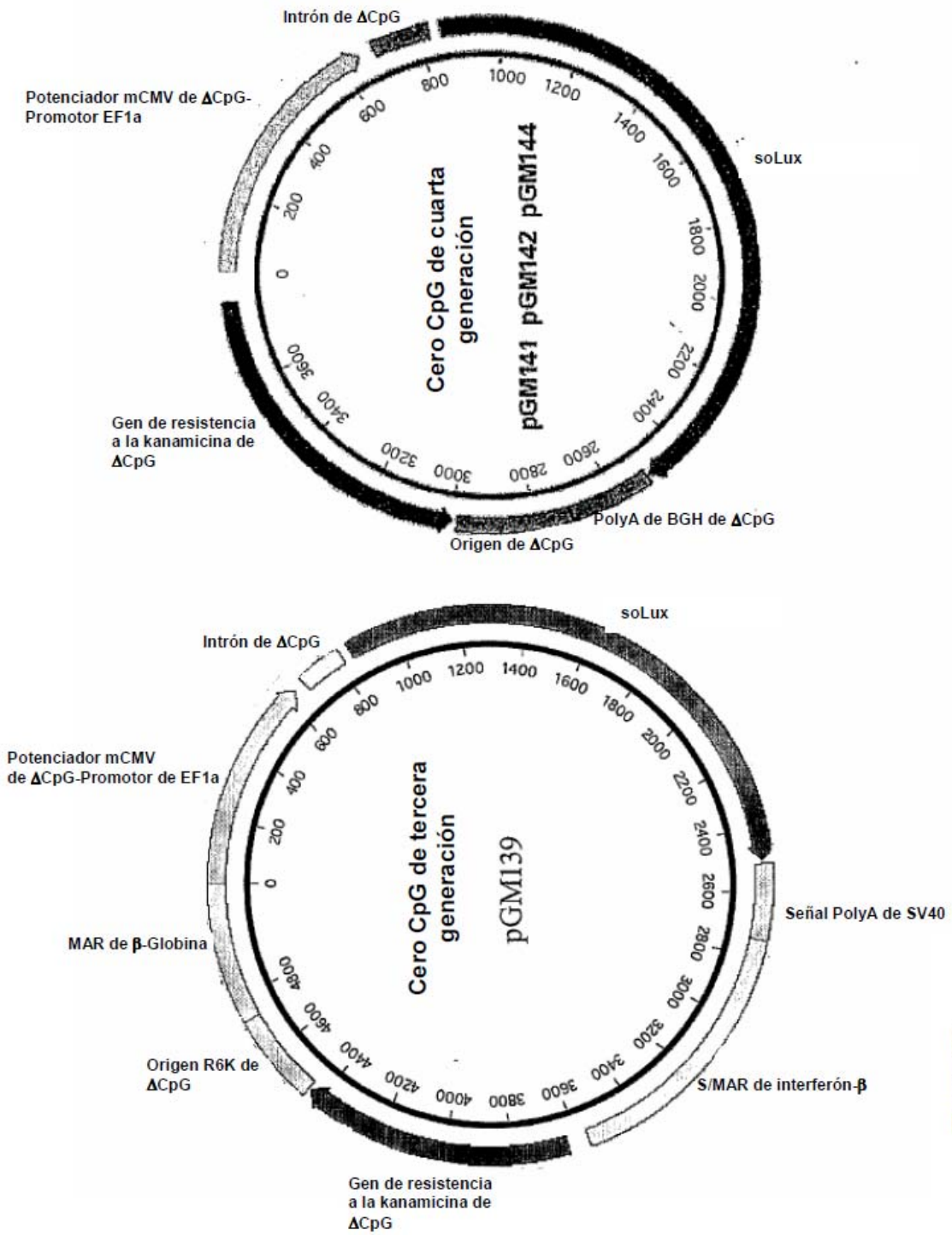


Figura 7b

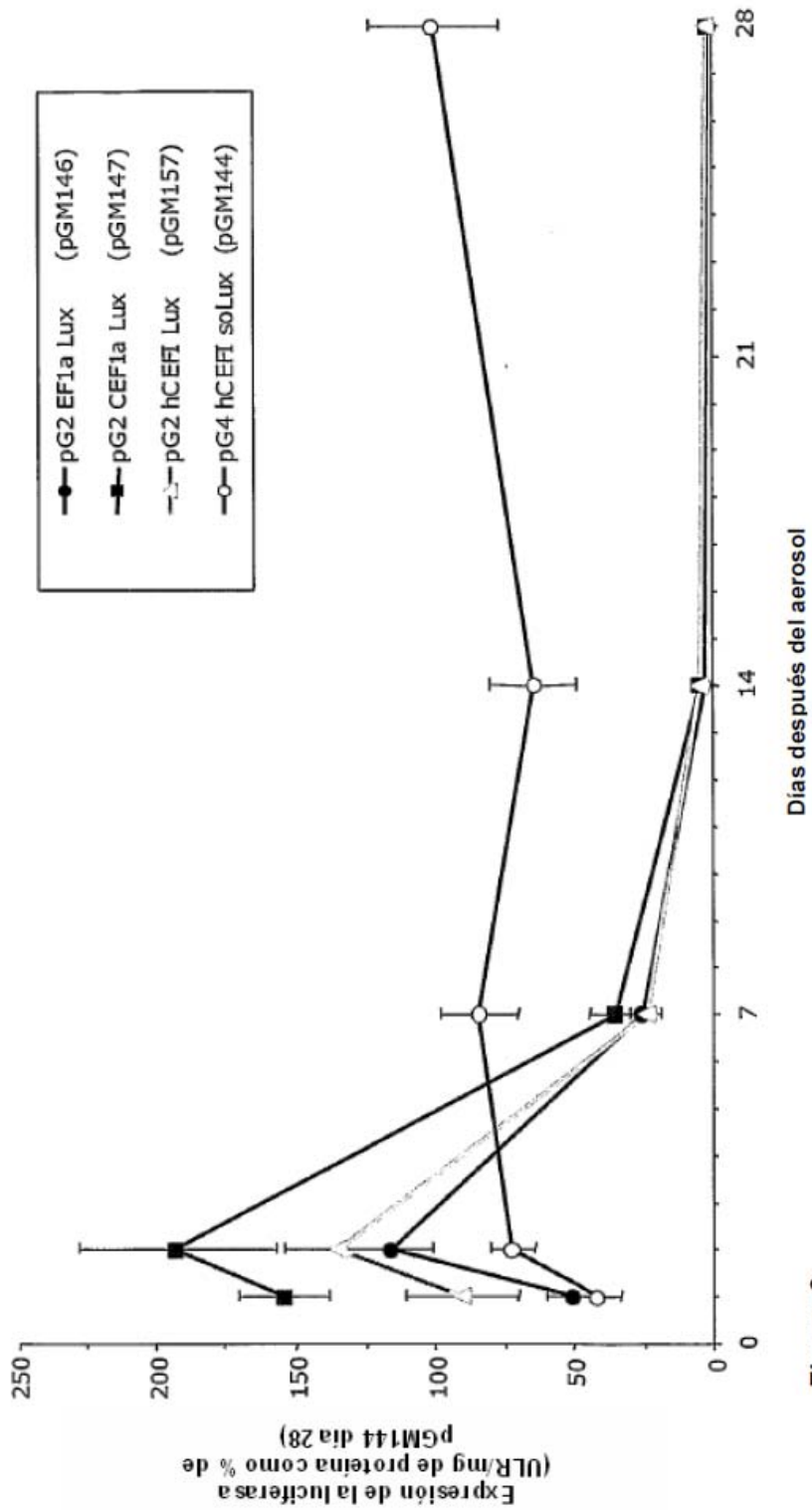


Figura 8

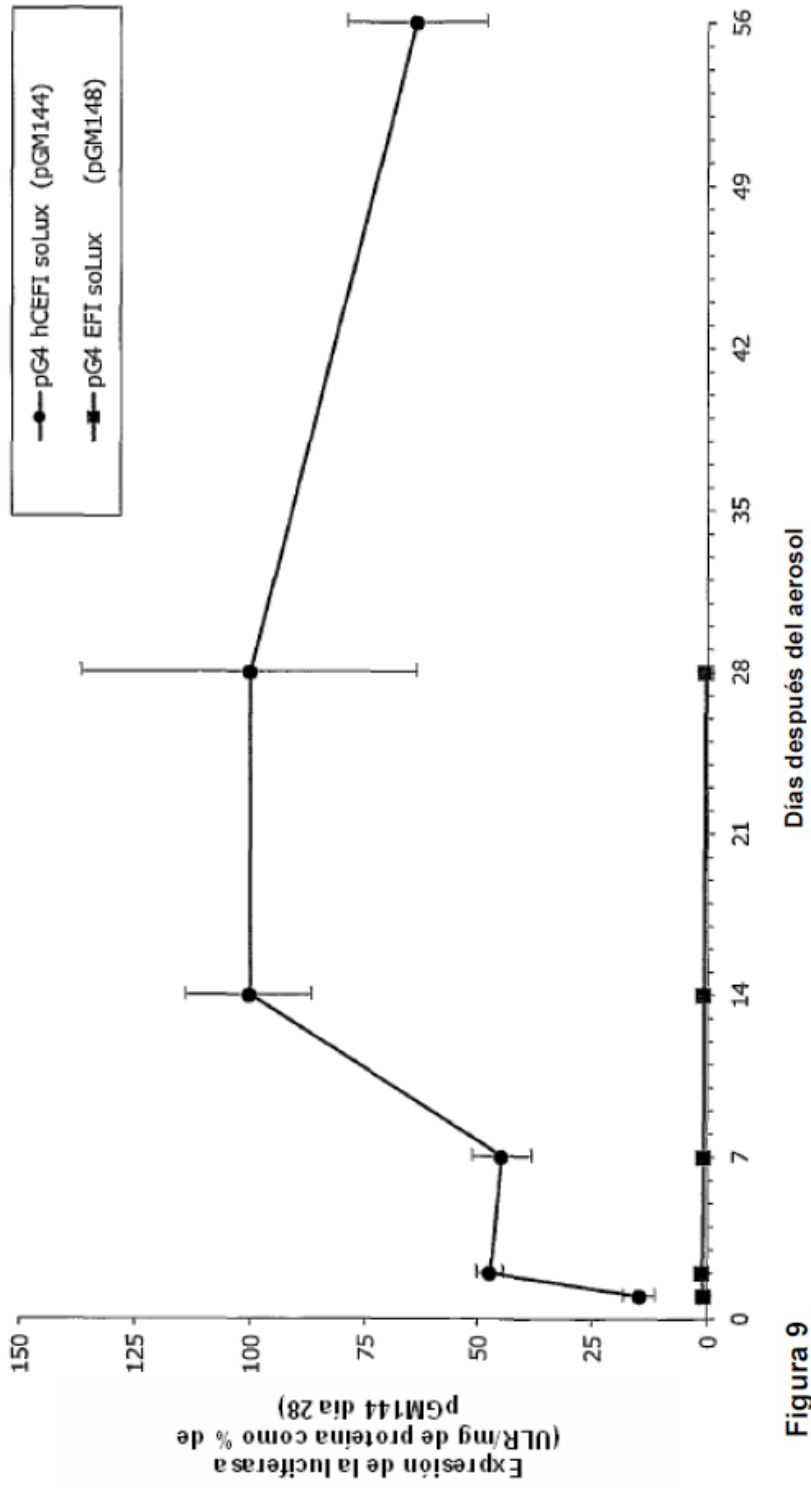


Figura 9