

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 672**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2012 PCT/EP2012/004610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13068096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2012 E 12783528 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2776568**

54 Título: **Módulo de expresión inducible y sus usos**

30 Prioridad:

08.11.2011 FR 1103392

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

29.01.2018

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)
147 rue de l'Université
75007 Paris, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FAFOURNOUX, PIERRE;
BRUHAT, ALAIN;
JOUSSE, CÉLINE;
MAURIN, ANNE-CATHERINE y
AVEROUS, JULIEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 651 672 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

Módulo de expresión inducible y sus usos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un módulo de expresión inducible que comprende una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), a un vector que lo comprende, a una composición farmacéutica que lo comprende y a una combinación que comprende dicho módulo para su uso en el marco de la terapia génica.

Técnica anterior

10 La terapia génica es una estrategia terapéutica fundada en la transferencia de un gen o genes en una célula u organismo hospedador. El principio aparece a finales de los años 1960, y el primer ensayo clínico se inicia en Estados Unidos 20 años después. El concepto, previamente considerado en el marco de las enfermedades genéticas, se extiende rápidamente al tratamiento de un gran número de otras patologías, tales como cánceres, enfermedades infecciosas o incluso enfermedades cardiovasculares.

15 El objetivo es suministrar genes medicamentos al paciente, usando la mayoría de estrategias consideradas vectores para vehicular el gen terapéutico hacia su diana celular. Los primeros vectores desarrollados están basados en una expresión constitutiva del gen medicamento. Ahora bien, en el marco de una terapia orientada y no tóxica, rápidamente pareció preferible limitar la expresión del gen terapéutico a tipos celulares dados, a un tiempo dado y/o durante un periodo dado. Se consideró por lo tanto el uso de sistemas inducibles. Así, la solicitud internacional WO 20 01/48182 A2 divulga sistemas de expresión sintéticos que comprenden un promotor mínimo asociado a un elemento de respuesta inducible por aminoácidos tales como serina o treonina. Por otro lado, los trabajos de Bruhat *et al.* (Mol. Cell. Biol. 2000, vol. 20(19), pág. 7192-7204) permitieron la identificación de una secuencia reguladora inducible por una carencia de aminoácidos y llamada AARE (elemento de respuesta a aminoácido). Aunque hoy en día están a disposición del especialista en la materia numerosos sistemas inducibles, resulta evidente la necesidad de nuevos sistemas más específicos, fácilmente activables y controlables con un nivel de expresión basal bajo para 25 un mínimo de efectos secundarios.

Compendio de la invención

30 La invención se refiere a un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y seleccionado del grupo de secuencias SEQ ID NO : 2, 4, 5 o 6 y (ii) un promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.

35 La invención se refiere por otro lado a un vector que comprende un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y seleccionado del grupo de secuencias SEQ ID NO: 2, 4, 5 o 6 y (ii) un promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO : 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.

40 La invención está relacionada con una composición farmacéutica que comprende un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 7 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.

45 La solicitud divulga igualmente un método para el tratamiento de enfermedades por terapia génica, comprendiendo dicho método:

- (i) una etapa de administración de un módulo de expresión, de un vector, de una célula hospedadora o de una composición farmacéutica según la invención a un paciente, y
- (ii) una etapa de inducción de la expresión del gen de interés comprendido en dicho módulo de expresión, dicho vector, dicha célula hospedadora o dicha composición farmacéutica.

50 Más particularmente, se pone en práctica dicha inducción mediante la aplicación de un régimen de carencia de aminoácido, preferiblemente un aminoácido esencial, a dicho paciente.

La presente invención cubre por último una combinación que comprende:

- un módulo de expresión que comprende un gen de interés que codifica un polipéptido que tiene un efecto

terapéutico para una afección diana ligado operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a AIF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y (ii) un promotor mínimo, un vector que comprende dicho módulo de expresión, una célula hospedadora que comprende dicho vector o dicho módulo de expresión o una composición farmacéutica que comprende dicho módulo de expresión, dicho vector o dicha célula hospedadora, y

- un régimen de carencia de un aminoácido esencial,

para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento por terapia génica de una afección diana elegida entre el grupo que comprende enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 describe esquemáticamente la ruta de señalización eIF2 α /ATF4, y especialmente la ruta GCN2/ATF4.

La Figura 1A describe la ruta de señalización general.

La Figura 1B describe más específicamente la ruta de señalización GCN2/ATF4. La carencia de cualquier aminoácido esencial (o indispensable) activa la cinasa GCN2. Como consecuencia de la fosforilación de eIF2 α , se induce el factor de transcripción ATF4. Va a fijarse sobre los elementos AARE localizados en el promotor de genes diana y activar la transcripción.

La Figura 2A ilustra un esquema del constructo 2XAARE-TK-Luc (usado en la parte experimental) insertado en un vector de expresión retroviral

La Figura 2B representa la secuencia del transgén 2XAARE-TK-LUC usado en la parte experimental.

La Figura 3 representa la valoración de la actividad luciferasa en tejidos de ratones transgénicos que exhiben un transgén que comprende un vector según la invención con la luciferasa como gen de interés, dos copias de la secuencia CARE del gen TRIB3 (secuencias AARE) y el promotor mínimo de la timidina cinasa (ratón AARE-LUC). Al principio del experimento nutricional, se pusieron en ayuno los ratones CARE-LUC durante 16 h. El día del experimento, se alimentaron los ratones durante 4 h o bien con el régimen de control (CTL) o bien con un régimen carente de leucina (-leu). Después de sacrificar los ratones, se valoró la actividad luciferasa en hígado, intestino, páncreas y cerebro.

La Figura 4 representa la medida de la actividad luciferasa después de la inyección de lentivirus en el cerebro.

Los vectores lentivirales se inyectan en el hipocampo del hemisferio izquierdo de ratas. Dos semanas después de la inyección, se ponen en ayuno los animales una noche y luego se alimentan con una comida de control y con carencia de treonina (-Thr). 6 horas después del inicio de la comida, se sacrifican los animales, se extraen los cerebros y se diseccionan. Se mide la actividad luciferasa en los hipocampos derechos e izquierdos así como el resto del hemisferio izquierdo. Se normaliza entonces la actividad Luc con relación al contenido proteico. Se usaron dos constructos: el constructo 2XAARE-TK-LUC (descrito en la figura 2) y el constructo de control TK-LUC donde se han retirado las secuencias AARE.

La Figura 5 muestra la reversibilidad de la inducción del transgén AARE-LUC en ratón como consecuencia del consumo de un régimen carente de leucina. (A) Visualización de la actividad luciferasa por imagenología de bioluminiscencia (umbral de detección 300-3000) en un ratón alimentado sucesivamente con (1) un régimen de control (CTL), (2) un régimen carente de leucina (-Leu) durante 4 h y (3) un régimen CTL durante 16 h. (B) Cuantificación de la bioluminiscencia en las zonas recuadradas. La luciferasa usada posee una semivida larga lo que explica la 16 h necesarias para reducir significativamente la actividad luciferasa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene como objeto un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y seleccionado del grupo de secuencias SEQ ID NO : 2, 4, 5 o 6 y (ii) un promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO :1 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.

El término “módulo de expresión” hace referencia a un elemento que comprende secuencias de ácidos nucleicos específicos para integrar en otra molécula de ácido nucleico o un genoma. Un módulo de expresión comprende en general uno o varios genes así como los elementos de control de la expresión de dicho (o dichos) genes (promotor, terminador...).

El término “promotor” es bien conocido por el especialista en la materia y se refiere a una región del ADN situada en la proximidad de un gen sobre el que se fija la ARN polimerasa con el fin de iniciar la transcripción.

5 Generalmente, la expresión “ligado operativamente” significa que la secuencia promotora está colocada con relación a la secuencia codificante del gen de interés de manera que la transcripción pueda comenzar. Esto significa que el promotor está colocado aguas arriba de la región codificante, a una distancia que permita la expresión de esta última.

Existen diferentes tipos de promotores tales como los promotores constitutivos o los promotores inducibles. Los promotores inducibles son promotores cuya actividad está controlada por las condiciones ambientales particulares o la presencia de un compuesto particular; permiten por lo tanto un control de la expresión del gen de interés.

10 Los promotores usados en el marco de la invención pueden derivar de genes nativos, o estar compuestos por diferentes elementos derivados de diferentes promotores naturales, o incluso pueden comprender segmentos de ADN sintéticos.

15 Se entiende por “promotor mínimo” un promotor consistente en un sitio de inicio de la transcripción y secuencias para la fijación del complejo de inicio de la transcripción (secuencia TATA) funcionales en una célula o un organismo hospedador.

Estos elementos son clásicos en el campo de la materia referido. Se pueden citar más particularmente los promotores mínimos de los genes TK, CMV y HSP (promotor mínimo del gen de la proteína de choque térmico de *Drosophile* desprovisto de su secuencia activadora).

20 De preferencia, el promotor usado según la invención es el promotor mínimo de timidina cinasa o un derivado de este. El promotor mínimo de timidina cinasa corresponde a la parte de -40 a +50 de la secuencias de la timidina cinasa, siendo +1 el sitio de inicio de la transcripción (Majumder S, DePamphilis ML, Mol Cell Biol, 1994); se define por la secuencia SEQ ID NO :1.

Secuencia del promotor mínimo de la timidina cinasa (SEQ ID NO :1)	<p>GTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCG AACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAACAGC GTCAACAGCGTGCCGC</p>
--	--

25 El término “derivado de” corresponde a una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia de referencia, particularmente al menos un 95 % de identidad y preferiblemente al menos un 99 % de identidad. El término “porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico” hace referencia al porcentaje de nucleótidos idénticos entre dos secuencias comparadas, estando obtenido dicho porcentaje mediante el mejor alineamiento de la secuencia completa. El término “mejor alineamiento” corresponde al alineamiento que permite obtener el porcentaje de identidad más elevado. Puede obtenerse usando diferentes algoritmos bien conocidos por el especialista en la materia (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA, GENETICS COMPUTER GROUP, 575 Science Dr., Madison, WI, EE.UU.).

El promotor puede ser un promotor eucariótico que debe ser funcional en el organismo hospedador.

35 Se entiende por “secuencia reguladora CARE” (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) cualquier secuencia diana de la ruta de señalización eIF2 α /ATF4 capaz de ligarse al factor de transcripción ATF4. En esta ruta, se liga el factor de transcripción ATF4 (factor de transcripción activante 4, también llamado CREB2, TAXREB67, TXREB) con estas secuencias CARE para inducir o regular la transcripción de genes diana en respuesta a un estrés ambiental dado (Kilberg *et al.*, Trends Endocrinol Metab. nov. de 2009; 20(9): 436-43).

40 Se han descrito diferentes secuencias CARE, especialmente para los genes siguientes: CHOP (proteína homóloga de C/EBP, también llamada GADD153), ASNS (asparagina sintetasa), SNAT2 (transportador de aminoácidos del sistema A), ATF3, TRIB3, Cat-1, xCT, HERP, VEGF y 4E-BP1.

45 Más particularmente, en el marco de la invención, se entiende por “elemento de respuesta de aminoácido” (AARE) secuencias reguladoras CARE dianas del factor de transcripción ATF4 en caso de carencia de aminoácido: estas secuencias CARE son secuencias CARE particulares diana en caso de fosforilación de eIF2 α por la cinasa GCN2, estando inducida esta fosforilación por una carencia de un aminoácido, preferiblemente una carencia de un aminoácido esencial.

Los ejemplos de secuencias AARE usadas según la invención comprenden, pero sin limitación, las secuencias CARE de los genes ASNS, SNAT2, ATF3 y TRIB3.

En un modo particular de realización de la invención, la secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia

AARE presente en el módulo de expresión usado según la invención comprende o consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que comprende: la secuencia CARE del gen TRIB3 (SEQ ID NO :2), la secuencia CARE del gen ASNS (SEQ ID NO :4), la secuencia CARE del gen ATF3 (SEQ ID NO :5) y la secuencia CARE del gen SNAT2 (SEQ ID NO :6), o un derivado de esta.

- 5 Preferiblemente, dicha secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia ARE presente en el módulo de expresión usado según la invención comprende o consiste en una o varias copias de la secuencia SEQ ID NO :2, o un derivado de esta.

Secuencia CARE del gen TRIB3 (SEQ ID NO :2)	CGGTTTGCATCACCCG
Secuencia CARE del gen CHOP (SEQ ID NO :3)	AACATTGCATCATCCC
Secuencia CARE del gen ASNS (SEQ ID NO:4)	GAAGTTTCATCATGCC
Secuencia CARE del gen ATF3 (SEQ ID NO :5)	AGCGTTGCATCACCCC
Secuencia CARE del gen SNAT2 (SEQ ID NO :6)	GATATTGCATCAGTTT

- 10 En un modo de realización particular de la invención, el promotor inducible comprendido en el módulo de expresión usado según la invención comprende una o varias copias de una secuencia reguladora CARE que contiene la secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido). Más particularmente, dicho promotor comprende al menos una, al menos dos o al menos tres copias de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido).

- 15 Más particularmente, el promotor inducible comprendido en el módulo de expresión usado según la invención comprende dos copias de una secuencia CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido).

De preferencia, el promotor inducible comprendido en el módulo de expresión usado según la invención comprende dos copias de la secuencia CARE que contienen una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) de TRIB3 (SEQ ID NO :2).

- 20 En un modo de realización preferido, el promotor del módulo de expresión usado según la invención comprende dos copias de la secuencia CARE que contienen una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) del gen TRIB3 (SEQ ID NO :2) y el promotor de timidina cinasa (SEQ ID NO :1). Preferiblemente, el promotor del módulo de expresión usado según la invención comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO :7 o un derivado de esta.

SEQ ID NO :7	GATTAGCTCCGGTTTGCATCACCCGGACCGGGGGATTAGCTCCG GTTTGCATCACCCGGACCGGGGGATTAGCTCCGGTTTGCATCAC CCGGACCGGGGGCCGGGCGCGTGCTAGCGATTAGCTCCGGTTT GCATCACCCGGACCGGGGGATTAGCTCCGGTTTGCATCACCCG GACCGGGGGATTAGCTCCGGTTTGCATCACCCGGACCGGGGAC TCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAA CACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGC GTGCCGC
--------------	---

- 25 Según la invención, la secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) comprendida en el módulo de expresión usado según la invención está colocada aguas arriba (en posición 5') o aguas abajo (en posición 3') del promotor mínimo. Preferiblemente, está colocada aguas arriba.

- 30 El promotor inducible usado en la invención, que comprende al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP- elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y un promotor mínimo, es inducible de preferencia por la carencia de aminoácido (uno o varios aminoácidos), más preferiblemente por una carencia de aminoácido esencial.

El gen de interés en uso en la presente invención puede obtenerse de un organismo eucariótico, de un procarionta, de un parásito o de un virus. Puede aislarse mediante cualquier técnica convencional en el campo de la materia, por

- ejemplo por clonación, PCR o síntesis química. Puede ser de tipo genómico, de tipo ADN complementario (ADNc) o de tipo mixto (minigén). Por otro lado, puede codificar un ARN anticodificante o un ARN interferente (tal como micro-ARN (o miARN por microARN), ARNip (ARN interferentes pequeños), ARNbc (ARN bicatenarios), ARNhc (ARN corto...)) y/o un ARN mensajero (ARNm) que se traducirá a continuación a polipéptido de interés, pudiendo ser este intracelular, incorporado a la membrana de la célula hospedadora o incluso secretado. Puede tratarse de un polipéptido tal como se encuentra en la naturaleza, de una porción de este, de un mutante que presenta especialmente propiedades biológicas mejoradas o modificadas o incluso de un polipéptido quimérico procedente de la fusión de secuencias de diversos orígenes. Por otro lado, el gen de interés puede codificar un ARN anticodificante, una ribozima o incluso un polipéptido de interés.
- El módulo de expresión usado según la invención permitirá expresar, sobreexpresar o inhibir la expresión de un gen de interés. Esta modulación de la expresión del gen de interés podrá controlarse de preferencia por la aplicación o no de un régimen de carencia de aminoácido o aminoácidos, preferiblemente aminoácido o aminoácidos esenciales.
- Entre los polipéptidos de interés utilizables, se pueden citar más particularmente las quimiocinas y citocinas (interferón α , β o γ , interleucinas (IL), especialmente IL-2, IL-6, IL-10 o incluso IL-12, factor de necrosis tumoral (TNF), factor estimulante de colonias (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, proteína quimioattractora de monocitos tal como MCP-1...), receptores celulares (especialmente reconocidos por el virus VIH), ligandos de receptor, factores de coagulación (factor VIII, factor IX, factor X, trombina, proteína C...), factores de crecimiento (FGF (factor de crecimiento fibroblástico), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)), enzimas (quinasas, fosfatasa, ureasa, renina, metaloproteínasa, NOS (óxido nítrico sintetasa), SOD, catalasa, LCAT (lecitina colesterol aciltransferasa...)), inhibidores enzimáticos (OE1-antitripsina, antitrombina HI, inhibidor de proteína vírica, PAI-1 (inhibidor de activador de plasminógeno)), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o II o polipéptidos que actúan sobre la expresión de los genes correspondientes, polipéptidos capaces de inhibir una infección vírica, bacteriana o parasitaria o su desarrollo, polipéptidos que actúan positiva o negativamente sobre la apoptosis (Bax, Bcl2, BclX...), agentes citostáticos (p21, p16, Rb), inmunoglobulinas totales o en parte (Fab, ScFv...), toxinas, inmunotoxinas, apolipoproteínas (ApoAI, ApoAIV, ApoE...), inhibidores de la angiogénesis (angiostatina, endostatina), marcadores (β -galactosidasa, luciferasa) o cualquier otro polipéptido que tenga un efecto terapéutico para la afección diana.
- Más precisamente, con el objetivo de tratar una disfunción hereditaria, se usará una copia funcional del gen defectuoso, por ejemplo un gen que codifica el factor VIII o IX en el marco de la hemofilia A o B, la distrofina (o minidistrofina) en el marco de miopatías de Duchenne y Becker, la insulina en el marco de la diabetes y la proteína CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística) en el marco de la mucoviscidosis.
- Al tratar de inhibir el inicio o la progresión de tumores o cánceres, se pondrá en práctica de preferencia un gen de interés que codifica un ARN anticodificante o un ARN interferente (miARN, ARNip, ARNbc, ARNhc...), una ribozima, un producto citotóxico (como timidina cinasa del herpesvirus simple 1 (TK-HSV-1), ricina, toxinas de cólera y difteria, un producto de los genes de levadura FCY1 y FUR1 que codifican uracilo fosforribosiltransferasa o incluso citosina desaminasa), una inmunoglobulina, un inhibidor de la división celular o de señales de transducción, un producto de expresión de un gen supresor tumoral (p53, Rb, p73, DCC...), un polipéptido estimulante del sistema inmunitario, un antígeno asociado a un tumor (MUC-1, BRCA-1, antígenos precoces o tardíos (E6, E7, LI, L2) de un papilomavirus humano HPV...), eventualmente en combinación con un gen de citocina.
- Sería un ejemplo de un gen de interés que permite inhibir la expresión de una proteína un ARNhc dirigido contra el receptor beta2ACh, que podría usarse para reducir la adicción al tabaco (Maskos *et al.*, *Nature* 2005).
- Por último, en el marco de una terapia anti-VIH, se puede recurrir a un gen que codifica un polipéptido inmunoprotector, un epitopo antigénico, un anticuerpo, el dominio extracelular del receptor CD4 (sCD4; Trauneker *et al.*, 1988, *Nature* 331, 84-86), una inmunoadhesina (por ejemplo, un híbrido CD4-inmunoglobulina IgG, Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337, 525-531; Byrn *et al.*, 1990, *Nature* 344, 667-670), una inmunotoxina (por ejemplo, fusión del anticuerpo 2F5 o la inmunoadhesina CD4-2F5 con angiogenina; Kurachi *et al.*, 1985, *Biochemistry* 24, 5494-5499), una variante trans-dominante (documentos EP 0614980, W095/16780), un producto citotóxico tal como uno de los mencionados anteriormente o incluso IFN- α o β .
- Uno de los genes de interés puede ser igualmente un gen de selección que permita seleccionar o identificar las células transfectadas o transducidas. Se pueden citar los genes neo (que codifica neomicina fosfotransferasa) que confiere resistencia al antibiótico G418, dhfr (dihidrofolato reductasa), CAT (cloranfenicol acetiltransferasa), pac (puromicina acetiltransferasa) o incluso gpt (xantina guanina fosforribosiltransferasa). De manera general, los genes de selección son conocidos por el especialista en la materia.
- Por otro lado, el módulo de expresión usado según la invención puede incluir, además, elementos adicionales que mejoren su expresión o su mantenimiento en la célula hospedadora (orígenes de replicación, elementos de integración en el genoma celular, secuencias intrónicas, secuencias de poliA de terminación de la transcripción, líderes tripartitos...). Estos elementos son conocidos por el especialista en la materia.
- Además, el gen de interés puede constar igualmente aguas arriba en la región codificante de una secuencia que

codifica un péptido señal que permite su secreción de la célula hospedadora. El péptido señal puede ser aquel del gen en cuestión o heterólogo (obtenido de un gen cualquiera secretado o sintético).

Finalmente, el gen de interés contiene un terminador.

5 En un modo de realización particular de la invención, el módulo de expresión usado según la invención comprende además la secuencia 5'UTR del gen ATF4 (SEQ ID NO :8, Vattem et al, PNAS, 2004; Lu et al J.Cell Biol 2004) o una secuencia similar, aguas arriba del sitio de inicio de la traducción del módulo.

10 Según la invención, una secuencia similar significa una secuencia 5' UTR de un gen que tiene la misma regulación traduccional que ATF4. Los ejemplos de genes que tienen una secuencia 5' UTR similar comprenden, pero sin limitación: GADD34 (Lee et al, J Biol Chem, 2009), ATF5 (Zhou et al, J Biol Chem, 2008) y BACE1 (Zhou et al, Mol Cell Biol, 2006).

SEQ ID NO :8	<p>TTTCTGCTTGCTGTCTGCCGGTTTAAGTTGTGTGCTCGGGTGTCC</p> <p>CTTTCCTCTTCCCCTCCCGCAGGGCTTGCGGCCACCATGGCGTA</p> <p>TTAGAGGCAGCAGTGCCTGCGGCAGCGTTGGCCTTGCAGCGG</p> <p>CGGCAGCAGCACCAGGCTCTGCAGCGGCAACCCCAACCGGCCT</p> <p>AAGCCATGGCGCTCTTCACGAAATCCAGCAGCAGTGTGCTGT</p> <p>AACGGACAAAGATACCTTCGAGTTAAGCACATTCCTCGAATCC</p> <p>AGCAAAGCCCCACAACATGACCGAGATGAGCTTCCTGAA</p>
--------------	---

15 La invención tiene por otro lado como objeto un vector que comprende un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y seleccionado del grupo de secuencias SEQ ID NO: 2, 4, 5 o 6 y (ii) un promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO : 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.

20 Según la invención, puede tratarse de un vector sintético (lípidos catiónicos, liposomas poliméricos,...), de un plásmido o incluso de un vector vírico.

25 Puede estar eventualmente asociado a una o varias sustancias que mejoran la eficacia transfeccional y/o la estabilidad del vector. Estas sustancias están ampliamente documentadas en la bibliografía accesible para el especialista en la materia (véanse, por ejemplo, Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol Soc. 32, 115-121; Hodgson y Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A modo ilustrativo, pero no limitante, puede tratarse de polímeros, de lípidos especialmente catiónicos, de liposomas, de proteínas nucleares o incluso de lípidos neutros. Estas sustancias pueden usarse solas o en combinación. Es una combinación viable un vector recombinante plasmídico asociado a lípidos catiónicos (DOGS, DC-CHOL, espermina-col, spermidina-col, etc.) y lípidos neutros (DOPE).

30 La elección de los plásmidos utilizables en el marco de la presente invención es vasta. Puede tratarse de vectores de clonación y/o de expresión. De manera general, son conocidos por el especialista en la materia y numerosos entre ellos están disponibles comercialmente, pero es igualmente posible construirlos o modificarlos mediante las técnicas de manipulación genética. Se puede citar a modo de ejemplos los plásmidos derivados de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) o incluso pPoly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). De preferencia, un plásmido puesto en práctica en el marco de la presente invención contiene 35 un origen de replicación que asegura el inicio de la replicación en una célula productora y/o una célula hospedadora (por ejemplo, se mantendrá el ColEI original para un plásmido destinado a producirse en E. coli, y el sistema oriP/EBNA1 si se desea que sea autorreplicativo en una célula hospedadora de mamífero, Lupton y Levine, 1985, Mol Cell Biol 5, 2533- 2542; Yates et al., Nature 313, 812-815). Puede comprender además un gen de selección que permita seleccionar o identificar las células transfectadas (complementación de una mutación auxotrófica, gen que 40 codifica la resistencia a un antibiótico,...). Puede comprender también elementos suplementarios que mejoran su mantenimiento y/o su estabilidad en una célula dada (secuencia cer que favorece el mantenimiento monomérico de un plásmido, secuencias de integración en el genoma celular).

45 Al tratarse de un vector vírico, se puede considerar un vector derivado de un adenovirus, lentivirus, retrovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), herpesvirus, alfavirus, parvovirus, poxvirus (viruela aviar, viruela del canario, virus de vacuna especialmente de la cepa MVA (virus Ankara modificado) o Copenhague...) o un espumavirus. Se recurrirá

de preferencia a un vector no replicativo y, eventualmente, no integrativo. Los retrovirus tienen la propiedad de infectar e integrarse mayoritariamente en células en división y a este respecto son particularmente apropiados para una aplicación en terapia anticancerosa. Un vector retroviral conveniente para la puesta en práctica de la presente invención consta de las secuencias terminales LTR (repetición terminal larga) y una región de encapsidación. Puede derivar de un retrovirus de cualquier origen (múrdo, primate, felino, humano, etc.) y en particular puede derivar de un retrovirus elegido entre el grupo que comprende MoMuLV (virus de leucemia de múrido Moloney), MVS (virus de sarcoma de múrido) o retrovirus de múrido Friend (Fb29). Se propaga en una estirpe de encapsidación capaz de proporcionar en trans los polipéptidos víricos gag, pol y/o env necesarios para la constitución de una partícula vírica. Se describen tales estirpes en la bibliografía (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc.). El vector retroviral según la invención puede constar de modificaciones especialmente al nivel de las LTR (reemplazos de la región promotora por un promotor eucariótico) o de la región de encapsidación (reemplazo por una región de encapsidación heteróloga, por ejemplo de tipo VL30) (véanse las solicitudes francesas 9408300 y 9705203).

En un modo de realización preferido de la invención, el vector usado según la invención es un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector derivado de un virus asociado a adenovirus (AAV).

Según un modo de realización ventajoso, el vector vírico usado según la invención puede estar en forma de un vector de ADN o partícula vírica infecciosa.

La presente solicitud divulga igualmente una célula hospedadora que comprende un vector o un módulo de expresión para uso según la invención.

Tal como se usa aquí, una célula está constituida por cualquier célula transfectable por un vector tal como se describe anteriormente.

En particular, puede usarse una célula de mamífero, preferiblemente una célula humana. Puede tratarse de una célula primaria o tumoral de cualquier origen, especialmente hematopoyética (citoblasto totipotente, leucocito, linfocito, monocito o macrófago...), muscular (célula satélite, miocito, mioblasto, músculo liso...), cardíaca, pulmonar, traqueal, hepática, epitelial o fibroblástica, pero también citoblastos.

La presente invención tiene igualmente como objeto una composición farmacéutica que comprende un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.

Una composición farmacéutica usada según la invención está más particularmente destinada al tratamiento preventivo o curativo de enfermedades por terapia génica (incluyendo inmunoterapia) y se enfrenta más particularmente a las enfermedades proliferativas (cánceres, tumores, displasias, etc.), a las enfermedades infecciosas y especialmente víricas (inducidas por ejemplo por los virus de hepatitis B o C, el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), herpes, retrovirus, etc.), a las enfermedades genéticas (mucoviscidosis, miopatías, hemofilias, diabetes...), a las enfermedades cardiovasculares (reestenosis, isquemia, dislipidemia...) o incluso a las enfermedades neurológicas (enfermedades psiquiátricas, enfermedades neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer, adicciones por ejemplo al tabaco, alcohol, a las drogas, epilepsia...).

Una composición farmacéutica usada según la invención puede fabricarse de manera convencional con vistas a una administración por vía local, parenteral o digestiva, pero también por estereotaxia. En particular, se asocia una cantidad terapéuticamente eficaz de agente terapéutico o profiláctico con un soporte aceptable desde un punto de vista farmacéutico. Las vías de administración consideradas son múltiples. Se pueden citar, por ejemplo, la vía intragástrica, subcutánea, intracardiaca, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratumoral, intranasal, intrapulmonar o intratraqueal. Para estos tres últimos modos de realización, es ventajosa una administración por aerosol o instilación.

La administración puede tener lugar en dosis única o repetida una o varias veces después de un cierto plazo de intervalo. La vía de administración y las dosis apropiadas varían en función de diversos parámetros, por ejemplo del individuo, la patología, el gen de interés para transferir y la vía de administración. Cuando se pone en práctica un vector, pueden considerarse dosis que comprenden de 0,01 a 100 mg de ADN, de preferencia de 0,05 a 10 mg y, de manera muy preferida, de 0,5 a 5 mg.

La formulación puede incluir igualmente un diluyente, un adyuvante o un excipiente aceptable desde un punto de vista farmacéutico, al igual que agentes de solubilización, estabilización y conservación. Una composición preferida está en forma inyectable. Puede formularse en disolución acuosa, salina (fosfato, monosódica, disódica, magnesio, potasio...) o isotónica.

Puede presentarse en dosis única o en multidoses en forma líquida o seca (polvo, liofilizado...) susceptible de reconstituirse de manera extemporánea por un diluyente apropiado.

La presente solicitud divulga igualmente el uso terapéutico o profiláctico de un módulo de expresión, un vector o una

- 5 célula hospedadora tales como los descritos anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado a la transferencia y la expresión de un gen de interés (comprendido en dicho módulo de expresión, dicho vector o dicha célula hospedadora) en una célula u organismo hospedador. En particular, el módulo de expresión, el vector o la célula hospedadora usados según la invención están destinados al tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia génica.
- La invención tiene por lo tanto como objeto un módulo de expresión o un vector que lo comprende tal como los descritos anteriormente para uso en el tratamiento de enfermedades por terapia génica.
- 10 Según una primera posibilidad, el medicamento puede administrarse directamente *in vivo* (por ejemplo, por inyección intravenosa, en un tumor accesible, en los pulmones por aerosol, en el sistema vascular mediante una sonda apropiada o incluso por estereotaxia en el cerebro). Se puede adoptar igualmente el enfoque *ex vivo* que consiste en extraer células del paciente (citoblastos de la médula ósea, linfocitos de sangre periférica, células musculares...), transfectarlas *in vitro* según técnicas de la materia y readministrar al paciente después de una etapa de amplificación eventual.
- 15 Pueden considerarse la prevención y el tratamiento de numerosas patologías. Un uso preferido consiste en tratar o prevenir cánceres, tumores y enfermedades resultantes de una proliferación celular no deseada. Entre las aplicaciones consideradas, se pueden citar cánceres de mama, de útero (especialmente aquellos inducidos por papilomavirus HPV), de próstata, de pulmón, de vejiga, de hígado, de colon, de páncreas, de estómago, de esófago, de laringe, del sistema nervioso central y de la sangre (linfomas, leucemia, etc.). Es igualmente útil en el marco de las enfermedades cardiovasculares, por ejemplo para inhibir o retardar la proliferación de células de músculos lisos de la pared vascular (reestenosis). Además, en lo referente a las enfermedades infecciosas, puede considerarse especialmente la aplicación al SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Por último, es particularmente apropiado para el tratamiento de enfermedades neurológicas (enfermedades psiquiátricas, neurodegenerativas, adicciones...).
- 20 La invención divulga igualmente un método para el tratamiento de enfermedades por terapia génica, comprendiendo dicho método:
- 25 (iii) una etapa de administración de un módulo de expresión, un vector, una célula hospedadora o una composición farmacéutica tales como los descritos anteriormente a un paciente, y
- (iv) una etapa de inducción de la expresión del gen de interés comprendido en dicho módulo de expresión, dicho vector, dicha célula hospedadora o dicha composición farmacéutica.
- 30 El término "paciente" hace referencia a un mamífero, preferiblemente un ser humano, que está aquejado de una patología que puede tratarse por terapia génica. Estas patologías son conocidas por el especialista en la materia, y comprenden especialmente cánceres, enfermedades infecciosas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades genéticas. Se describen ejemplos en la presente descripción.
- La etapa de administración se realiza según métodos conocidos en la técnica anterior.
- 35 La etapa de inducción se realizan sometiendo dicho paciente a un estímulo ambiental que permita inducir la fosforilación de eIF2 α (y así la activación de la ruta de señalización eIF2 α /ATF4).
- Así, el estímulo experimentado por el paciente puede ser una carencia de aminoácido, de preferencia una carencia de aminoácido esencial.
- 40 En este caso, el módulo de expresión (comprendido o no en un vector o una célula hospedadora) usado según la invención comprende más particularmente la secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE de un gen seleccionado del grupo que comprende TRIB3, ASNS, ATF3 y SNAT2 o una secuencia derivada de estas. Preferiblemente, el promotor usado es el promotor definido por la secuencia SEQ ID NO:7.
- 45 El estímulo experimentado por el paciente puede ser la inducción de una infección vírica o la administración de una molécula que imita una infección vírica. Efectivamente, se activa la ruta de eIF2 α /ATF4 con una infección vírica por la presencia de ARN bicatenario producido por el virus, por citocinas e interferón o incluso por la proteína PACT y por heparina. Así, una infección vírica puede imitarse por uno de estos elementos.
- El estímulo experimentado por el paciente puede ser igualmente la inducción de un estrés del retículo endoplásmico. Tal estrés puede inducirse especialmente por un cierto número de fármacos tales como los anticancerosos bortezomib, tunicamicina, ditiotreitol, tapsigargina o brefeldina A, o por una inyección de lipopolisacárido.
- 50 El estímulo experimentado por el paciente puede ser la inducción de una carencia de hemo.
- El estímulo experimentado por el paciente puede ser un régimen rico en lípidos.
- El estímulo experimentado por el paciente puede ser un choque térmico o un choque osmótico.

En un modo de realización preferido de la invención, se somete el paciente a un régimen de carencia de un aminoácido esencial (también llamado aminoácido indispensable). Los aminoácidos esenciales son fenilalanina, leucina, metionina, lisina, isoleucina, valina, treonina, triptófano e histidina.

5 Se entiende por "régimen de carencia de aminoácido" cualquier medio o cualquier composición que permita aplicar a un paciente una carencia de aminoácido tal como se describe anteriormente. De preferencia, se aplica al paciente una carencia de un aminoácido esencial. Puede tratarse de composiciones que comprenden un cóctel de aminoácidos libres en el que está ausente un aminoácido, preferiblemente un aminoácido esencial.

10 Tal régimen se administrará preferiblemente después de un ayuno de corta duración, y puede aportarse en forma de un cóctel de aminoácidos libres o de una comida completa en la que las proteínas se reemplazan por una mezcla de aminoácidos libres. El agotamiento en sangre del aminoácido esencial sobreviene muy rápidamente (varios minutos después de la toma de la comida con carencia) y puede detenerse muy rápidamente por la administración del aminoácido esencial faltante. La carencia de cualquiera de los nueve aminoácidos indispensables es funcional. La elección del aminoácido (o aminoácidos) para retirar de la alimentación del paciente podrá realizarse por un especialista en la materia, con el objetivo de minimizar los efectos secundarios ligados al tratamiento y teniendo en cuenta la facilidad para preparar una alimentación con carencia.

15 Es posible por otro lado, para un tratamiento a medio o largo plazo, alternar la carencia de diferentes aminoácidos esenciales. Al no ser tóxica una sola comida con carencia de un solo aminoácido, preferiblemente esencial, el uso de un módulo según la invención presenta una ventaja única con relación a otros sistemas inducibles que no son utilizables en medicina humana.

20 En un modo de realización particular, se somete el paciente a regímenes de carencia de un aminoácido sucesivos, cada uno de un aminoácido diferente (por ejemplo, un régimen con carencia de leucina, seguido de un régimen con carencia de valina, y luego un régimen con carencia de lisina...). Esto permite mantener una carencia que permite la inducción de la expresión del gen de interés de la invención, sin imponer por otro lado al paciente una carencia prolongada de un aminoácido, que podría ser perjudicial.

25 Es posible aplicar al paciente un régimen de carencia de uno o varios aminoácidos.

El uso de un módulo de la invención en el marco de una inducción de la expresión del gen por carencia de aminoácido permite controlar de manera precisa el inicio y la duración del periodo de inducción de la expresión del gen de interés. Además, la respuesta postinducción, así como la extinción de la expresión del gen de interés (por administración del aminoácido faltante) son rápidas. Por otro lado, el módulo de expresión usado según la invención conlleva un bajo nivel de expresión basal y un nivel de activación alto.

30 El paciente puede someterse igualmente a la administración de una enzima consumidora de aminoácidos (Amino Acid Consuming Enzyme).

35 Es un ejemplo de enzima consumidora de aminoácidos la asparaginasa. La administración de dicha enzima consumidora de aminoácidos se realiza de preferencia por vía intravenosa. Este tipo de administración es bien conocido por el especialista en la materia (Pieters R. *et al.*, Cancer, 2011; Patil S *et al.*, Cancer Treat Rev, 2011).

En otro modo particular de realización, se usa el módulo de expresión en patologías en las que se activa la ruta eIF2alfa/ATF4, tales como cánceres (Ye *et al.*, EMBO J, 2010) o epilepsia (Carnevalli *et al.*, Biochem J, 2006). En este modo de realización particular, la etapa de inducción de la expresión del gen de interés (ii) del método de la invención no es ya necesaria.

40 En este marco, la invención divulga igualmente un método para el tratamiento de patologías en las que se activa la ruta eIF2alfa/ATF4 por terapia génica, comprendiendo dicho método una etapa de administración de un módulo de expresión, un vector, una célula hospedadora o una composición farmacéutica tales como se describen anteriormente a un paciente.

Tales patologías comprenden especialmente cánceres y epilepsia.

45 La invención divulga igualmente un método para el tratamiento de enfermedades por terapia génica, comprendiendo dicho método:

- (i) una etapa de administración de un módulo de expresión, un vector, una célula hospedadora o una composición farmacéutica tales como se describen anteriormente a un paciente, y
- 50 (ii) una etapa de inducción de la expresión del gen de interés comprendido en dicho módulo de expresión, dicho vector, dicha célula hospedadora o dicha composición farmacéutica, caracterizado porque dicha inducción (a) se pone en práctica por la aplicación de un régimen de carencia de aminoácido, preferiblemente un régimen de carencia de aminoácido esencial, a dicho paciente y (b) es simultánea, separada o secuencial a la etapa (i).

El paciente puede someterse a regímenes de carencia de un aminoácido sucesivos, cada uno de un aminoácido diferente tal como se describe anteriormente. También es posible aplicar al paciente un régimen de carencia de uno o varios aminoácidos, preferiblemente un régimen de carencia de uno o varios aminoácidos esenciales.

La presente invención cubre por último una combinación que comprende:

- 5 – un módulo de expresión que comprende un gen de interés que codifica un polipéptido que tiene un efecto terapéutico para una afección diana ligada operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y (ii) un promotor mínimo, un vector que comprende dicho módulo de expresión, una célula hospedadora que comprende dicho vector o dicho
- 10 módulo de expresión o una composición farmacéutica que comprende dicho módulo de expresión, dicho vector, dicha célula hospedadora y
- un régimen de carencia de un aminoácido esencial,

15 para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento por terapia génica de una afección diana elegida entre el grupo que comprende enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares.

De preferencia, el promotor mínimo usado en la combinación según la invención es el promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO : 1.

20 En un modo de realización particular de la invención, el promotor mínimo usado en la combinación según la invención es el promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO : 1 y el promotor inducible comprende al menos una copia de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), preferiblemente al menos dos copias de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta de aminoácido) elegida o elegidas entre las SEQ ID NO :2, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO :5 o SEQ ID NO :6.

25 En un modo de realización preferido de la invención, el promotor inducible usado en la combinación según la invención comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7.

EJEMPLOS

Aparecerán otras características de la invención en los ejemplos siguientes, sin que estos constituyan por otro lado una limitación ninguna de la invención.

Material y Métodos

30 Realización del transgén AARE-TK-LUC.

35 Se obtuvo el constructo 2XAARE TRIB3-TK-LUC representado en la Figura 2 subclonando un oligonucleótido bicatenario que contiene 2 copias de la secuencia CARE/AARE de TRIB3 (-7131 a -7033) en el sitio MluI-XhoI del constructo plasmídico TATA-TK-LUC que contiene la secuencia codificante del gen de luciferasa procedente de pGL3 basic (Promega). Se secuenció el constructo y luego se ensayó la respuesta a la carencia de leucina por transfección transitoria de las células humanas HepG2 (hepatoma de hígado) y de múrido (MEF: fibroblastos embrionarios de ratón).

40 Se clonó a continuación el fragmento de ADN correspondiente a las secuencias del transgén 2XARRE-TK-LUC en los sitios BamHI/XbaI del vector lentivírico pRRL.PPT.SF.GFPpre 1xHS4 (Schambach A, Galla M, Maetzig T, Loew R, Baum C. *Mol Ther.* junio de 2007; 15(6): 1167-73) que contiene las secuencias "aislantes" 5'HS4 de β -globina de pollo. Para verificar la inductibilidad del transgén AARE-LUC a través de la ruta de señalización de eIF2 α /ATF4, se infectaron células HeLa con estas partículas lentivíricas. Los resultados muestran que el transgén LUC, integrado de manera estable en las células HeLa e inducido por una disminución de la concentración de leucina de manera dependiente de la dosis del orden de las observadas en plasma de ratones (30 a 70 μ M) y por diferentes concentraciones de tunicamicina, un agente que induce el estrés del retículo endoplasmático.

45 Generación de ratones transgénicos

50 Para generar ratones transgénicos AARE-TK-LUC, se microinyectaron partículas lentivíricas en el espacio perivitelino de un ovocito en el estado de una célula procedente de ratón C57BL/6JxDB/2J (Charles River, Wilmington, MA). Esta integración germinal lentivírica permitía obtener más de un 50 % de fundadores portadores del transgén. Se obtuvieron así 15 estirpes independientes, pero solamente 5 fundadores constaban de al menos una copia del transgén integrado. Se obtuvo una descendencia F1 para estos 5 ratones fundadores F0 seleccionados.

Valoración de la actividad luciferasa en los extractos de tejidos

Se midió la actividad luciferasa en los extractos de células o de tejidos usando un kit comercial (YELEN, Ensue La Redonne, Francia). La actividad luciferasa relativa corresponde a la relación entre la actividad luciferasa y la cantidad de proteínas.

Medida de la bioluminiscencia por imagenología

- 5 Se visualizó la actividad luciferasa en ratones AARE-LUC vivos con una unidad de imagenología *in vivo* NightOWL II LB 983 NC100 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Este sistema usa una cámara CCD ultrasensible refrigerada por efecto Peltier de barrido lento equipada con un objetivo de 25 mm/0,95 situado en una cámara negra estanca y termocontrolada que permite la detección de niveles muy bajos de luz emitida por una célula que expresa un gen trazador como la luciferasa. Está igualmente dotado de un sistema de anestesia gaseosa integrado. Para la
- 10 detección de la bioluminiscencia, se anestesiaron los ratones con isoflurano (inducción con 5 % de isoflurano, mantenimiento a 2 % en 70 % de aire-30 % de oxígeno) y recibieron una inyección intraperitoneal de una disolución acuosa de luciferina (Caliper LIFE SCIENCES, 150 mg/kg) 10 min antes de la medida de la emisión de fotones (2 x 4 min de integración, agrupamiento de píxeles 8x8), para obtener una biodistribución uniforme del sustrato. Las
- 15 imágenes de bioluminiscencia se presentan como imágenes seudocoloreadas superpuestas a una fotografía adquirida antes que la imagen de bioluminiscencia a niveles de gris usando el software WinLight (Berthold Technologies). Se cuantifica a continuación la intensidad de la señal bioluminiscente al nivel de las regiones de interés con el software WinLight y se expresa en número de fotones por segundo.

Resultados

Medida de la actividad luciferasa en los tejidos

- 20 En un primer momento, se realizó la evaluación de la inductibilidad del transgén AARE-TK-LUC con carencia de leucina midiendo la actividad luciferasa en los diferentes tejidos de diferentes estirpes transgénicas. Se habituaron los ratones de aproximadamente 2 meses de edad durante 7 días a un régimen de control (CTL) que contenía todos los aminoácidos indispensables. A continuación, tras haber puesto en ayuno durante 16 h, se alimentaron con el
- 25 régimen CTL o bien con un régimen de carencia de leucina (-Leu) y luego se sacrificaron para la extracción de diferentes tejidos. El análisis de la actividad luciferasa muestra que el consumo de un régimen desprovisto de leucina conlleva una fuerte inducción de la actividad LUC en hígado, intestino, páncreas y cerebro (Figura 3). Se confirmó este perfil de expresión del gen LUC midiendo el nivel de ARNm de LUC.

Medida de la bioluminiscencia en ratones vivos

- 30 A continuación, se visualizó la inducción de la expresión del gen de luciferasa por carencia de leucina correspondiente a la activación de la ruta de señalización de eIF2 α /ATF4 por imagenología de bioluminiscencia en animales vivos. Como anteriormente, los ratones se aclimataron en primer lugar con un régimen de CTL durante 7 días y a continuación se realizaron dos tipos de experimentos:

- en un primer caso, se pusieron en ayuno los ratones durante 16 h. El día del experimento, se alimentaron durante 4 h o bien con el régimen de CTL o bien con un régimen de carencia de leucina (-leu). Después del
- 35 sacrificio de los ratones, se valoró la actividad luciferasa en diferentes tejidos (Figura 3);
- en un segundo caso, se alimentaron los ratones puestos en ayuno durante 16 horas con un régimen de carencia de leucina durante 4 h y a continuación se alimentaron con un régimen de control. Este experimento permite medir la reversibilidad de la expresión del transgén (Figura 5). En este caso, se midió la bioluminiscencia procedente de la luciferasa antes y después del consumo del régimen -leu. Se realizó el
- 40 recuento de fotones al nivel del abdomen. Los resultados obtenidos con la cara ventral muestran claramente un fuerte aumento de la luminiscencia en la región abdominal 4 h después del inicio de la comida. Se observa una fuerte disminución de la luminiscencia cuando los ratones son alimentados de nuevo con un régimen de control.

45

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Institut National de Recherche Agronomique	
	<120> MÓDULO DE EXPRESIÓN INDUCIBLE Y SUS USOS	
5	<130> INR-B-0009	
	<150> FR 11 03392	
	<151> 08-11-2011	
10	<160> 8	
	<170> PatentIn versión 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 89	
	<212> DNA	
	<213> Virus del Herpes Humano tipo 1	
20	<400> 1	
	gtccacttcg catattaagg tgacgcgtgt ggcctcgaac accgagcgc cctgcagcga	60
	cccgcctaac agcgtcaaca gcgtgccgc	89
	<210> 2	
	<211> 16	
25	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	cggttgcat cacccg	16
30	<210> 3	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 3	
	aacattgcat catccc	16
40	<210> 4	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
45	<400> 4	
	gaagttcat catgcc	16
	<210> 5	
	<211> 16	
	<212> DNA	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
	agcgttgcat cacccc	16
55	<210> 6	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
60	<400> 6	
	gatattgcat cagttt	16

ES 2 651 672 T3

<210> 7
 <211> 311
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Transgén

<400> 7
 gattagctcc ggtttgcac acccggaccg ggggattagc tccggtttgc atcaccggga 60
 ccgggggatt agctccggtt tgcacaccc ggaccggggg ccgggcgcgt gctagcgatt 120
 agctccggtt tgcacaccc ggaccggggg attagctccg gtttgcac caaccggaccgg 180
 gggattagct ccggtttgca tcaccgggac cggggactcg aggtccactt cgcatattaa 240
 ggtgacgcgt gtggcctcga acaccgagcg accctgcagc gaccgcgcta acagcgtcaa 300
 10 cagcgtgccg c 311

<210> 8
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15

<400> 8
 tttctgcttg ctgtctgccg gtttaagttg tgtgctcggg tgtcccttc ctcttcccct 60
 cccgcagggc ttgcggccac catggcgtat tagaggcagc agtgcctgcg gcagcgttgg 120
 cctttgcagc ggcggcagca gcaccaggct ctgcagcggc aacccccacc ggcctaagcc 180
 atggcgtctt tcacgaaatc cagcagcagt gttgctgtaa cggacaaaga taccttcgag 240
 ttaagcacat tcctcgaatc cagcaaagcc ccacaacatg accgagatga gcttcctgaa 300
 20

REIVINDICACIONES

1. Combinación que comprende:
 - 5 - un módulo de expresión que comprende un gen de interés que codifica un polipéptido que tiene un efecto terapéutico para una afección diana ligada operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y (ii) un promotor mínimo, un vector que comprende dicho módulo de expresión, una célula hospedadora que comprende dicho vector o dicho módulo de expresión o una composición farmacéutica que comprende dicho módulo de expresión, dicho vector o dicha célula hospedadora, y
 - 10 - un régimen de carencia de un aminoácido esencial,

para uso simultáneo, separado o secuencial para el tratamiento por terapia génica de una afección diana elegida del grupo que comprende enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares.
- 15 2. Combinación según la reivindicación 1, caracterizada porque el promotor mínimo es el promotor mínimo de la timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO : 1.
3. Combinación según la reivindicación 2, caracterizada porque el promotor inducible comprende al menos una copia de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), preferiblemente al menos dos copias de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), siendo dicha secuencia reguladora la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 20 4. Combinación según la reivindicación 2, caracterizada porque el promotor inducible comprende al menos una copia de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), preferiblemente al menos dos copias de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), siendo dicha secuencia reguladora la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 25 5. Combinación según la reivindicación 2, caracterizada porque el promotor inducible comprende al menos una copia de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), preferiblemente al menos dos copias de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), siendo dicha secuencia reguladora la secuencia SEQ ID NO : 5.
- 30 6. Combinación según la reivindicación 2, caracterizada porque el promotor inducible comprende al menos una copia de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), preferiblemente al menos dos copias de una secuencia reguladora CARE que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido), siendo dicha secuencia reguladora la secuencia SEQ ID NO : 6.
7. Combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque el promotor inducible comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO : 7.
- 35 8. Módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y seleccionado del grupo de secuencias SEQ ID NO : 2, 4, 5 o 6 y (ii) un promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO :1 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.
- 40 9. Módulo de expresión para su uso según la reivindicación 8, caracterizado porque el promotor inducible comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO : 7.
- 45 10. Vector que comprende un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende (i) al menos una secuencia reguladora CARE (C/EBP-elemento de respuesta a ATF) que contiene una secuencia AARE (elemento de respuesta a aminoácido) y seleccionado del grupo de secuencias SEQ ID NO : 2, 4, 5 o 6 y (ii) un promotor mínimo de timidina cinasa definido por la secuencia SEQ ID NO : 1 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.
- 50 11. Vector para su uso según la reivindicación 10, caracterizado porque el promotor inducible comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO : 7.
12. Vector para su uso según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque dicho vector es un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector derivado de un virus asociado a adenovirus.

13. Composición farmacéutica que comprende un módulo de expresión que comprende un gen de interés ligado operativamente a un promotor inducible que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO : 7 para su uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, enfermedades neurológicas o enfermedades cardiovasculares por terapia génica.

5

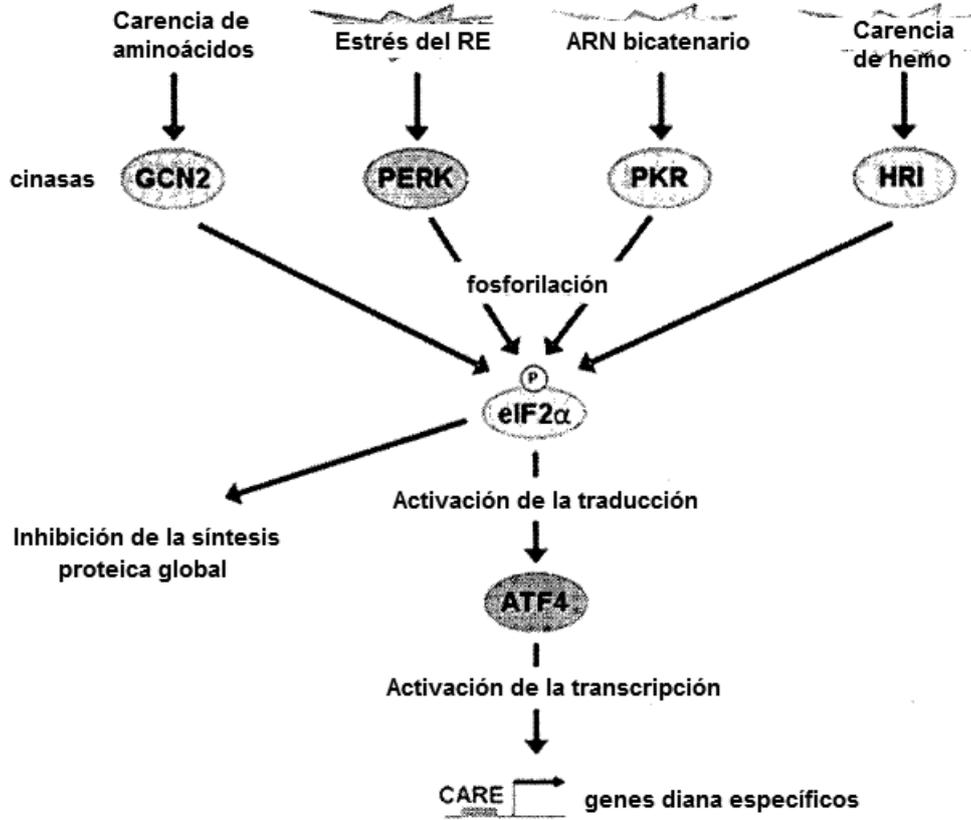


Figura 1A

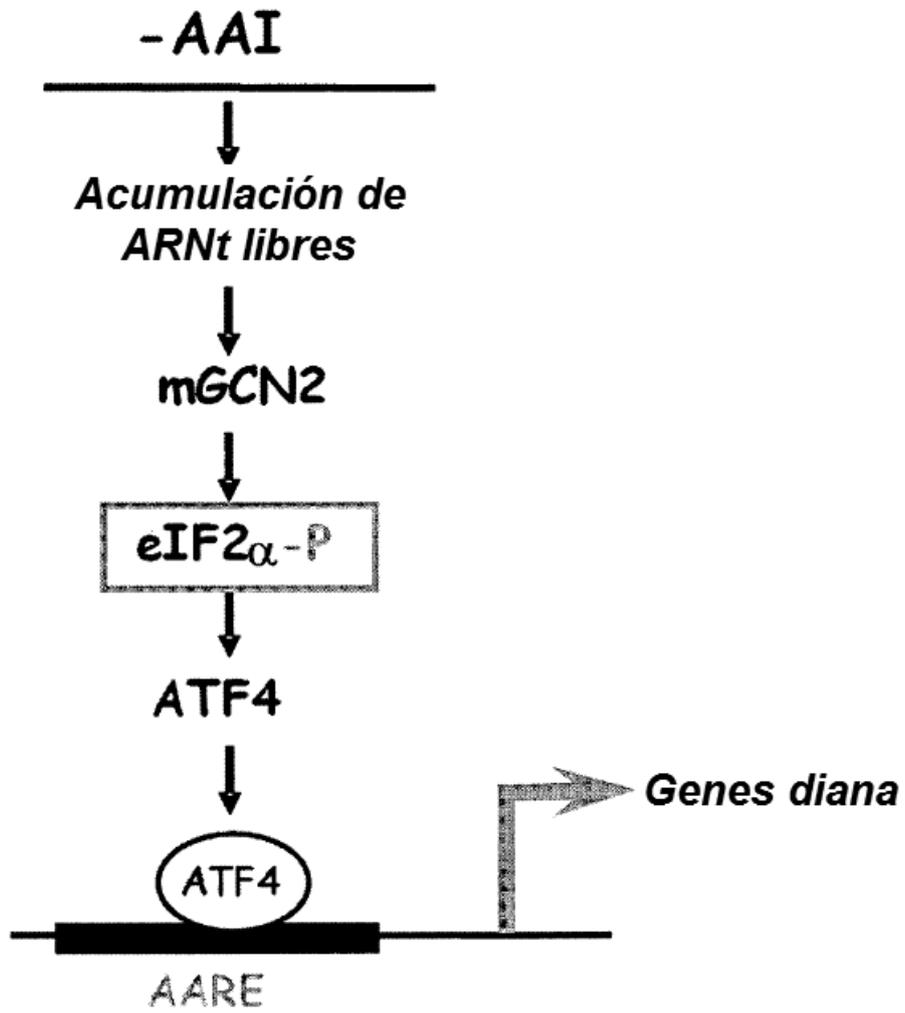


Figura 1B



Figura 2A

GGTACCGATTAGCTCCGGTTTGCATCACCCGGACCGGGGATTAGCTCCGGTTTGCATCACCCG
GACCGGGGGATTAGCTCCGGTTTGCATCACCCGGACCGGGGGCCGGGCGCGTGCTAGCGATTA
GCTCCGGTTTGCATCACCCGGACCGGGGGATTAGCTCCGGTTTGCATCACCCGGACCGGGGA
TTAGCTCCGGTTTGCATCACCCGGACCGGGGACTCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGC
GTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCGC
AAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGC
CCGGCGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGA
GATACGCCCTGGTTCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTAC
GCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAA
TCACAGAATCGTCGATGCAGTAAAACCTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGGCGCGTTATT
TATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCAAGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGGG
CATTCGCAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAA
AAAAGCTCCCAATCATCCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTTCAGT
CGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAGT
CCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAA
GGTGTGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGG
CAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTGGAATGTTT
ACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTG
TTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTT
CTTCGCCAAAAGCACTCTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGG
CGCTCCCCTCTCTAAGGAAGTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGG
CAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACC
GGGCGCGGTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGAAA
ACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGT
AAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAG
CTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAA
GGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACACCCCAACATCTTCGACGC
AGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCCGCGTTGTTGTTTTGGAG
CACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGA
AAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGGAAAACTCGA
CGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAATTC
 TAGA

Secuencias reguladoras CARE: 2xAARE TRIB3

Secuencia promotora: TK

Secuencia del gen de interés, luciferasa: LUC

Otras secuencias (sitios de restricción...)

Figura 2B

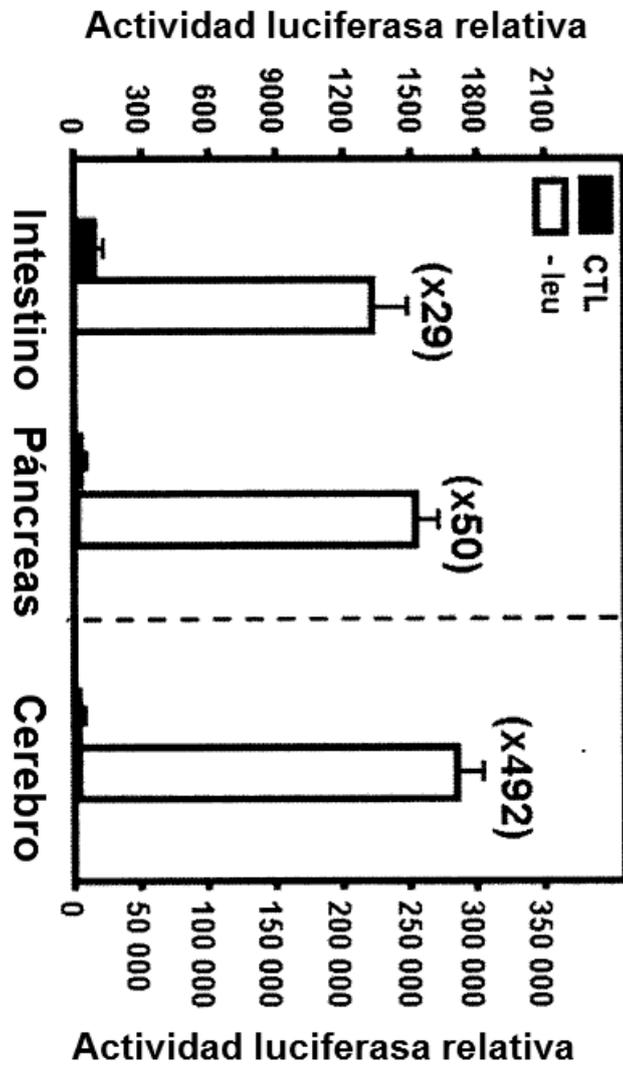
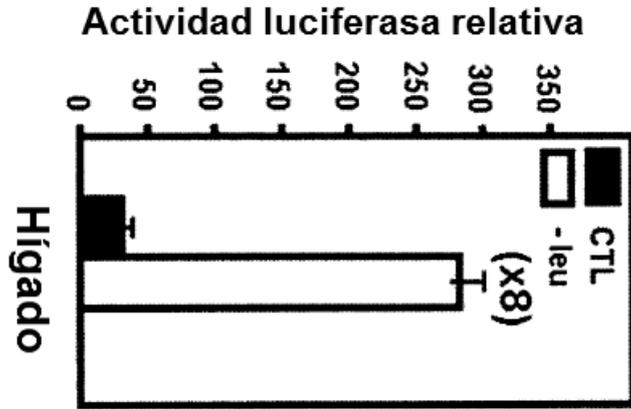


Figura 3

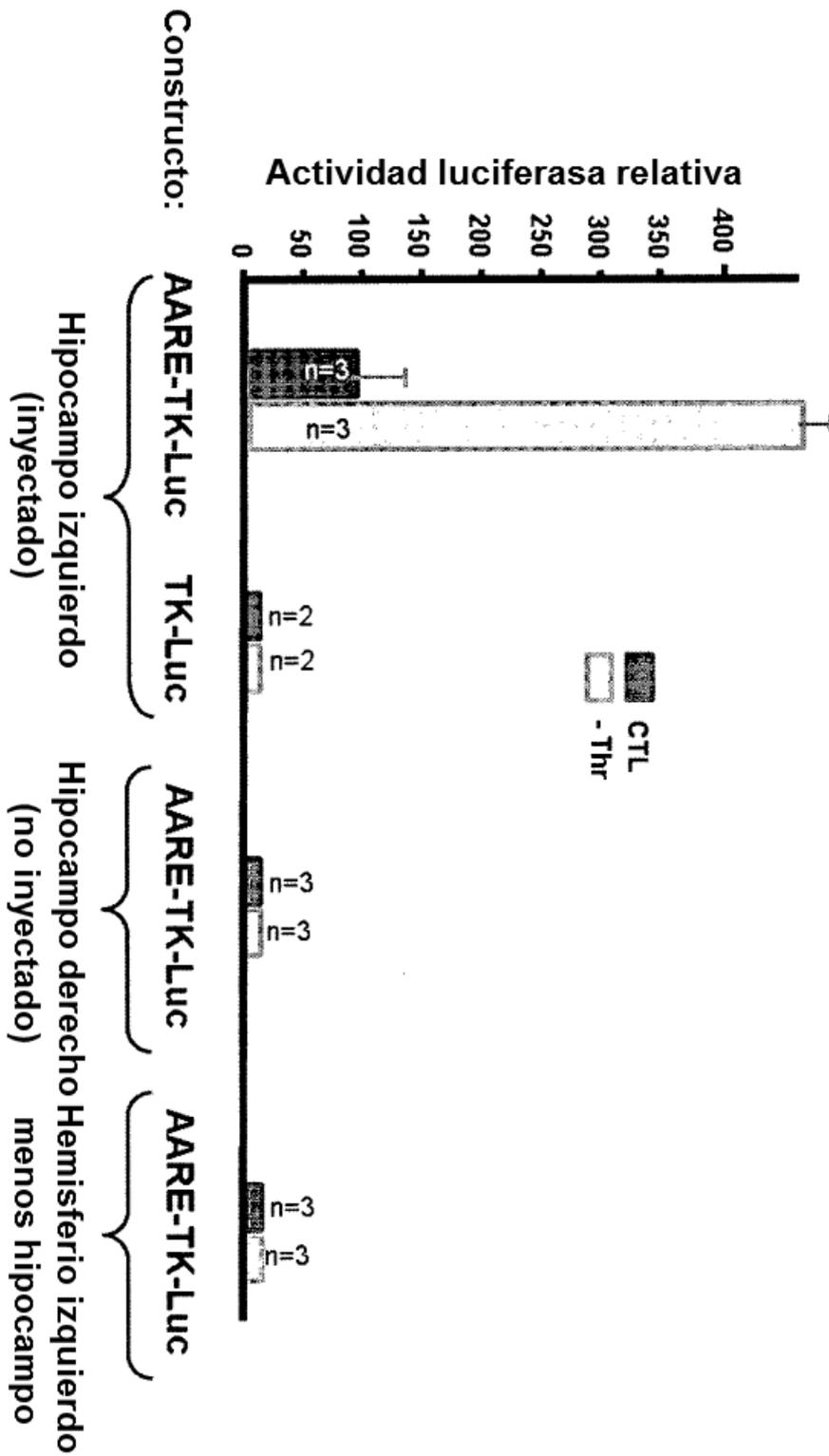


Figura 4

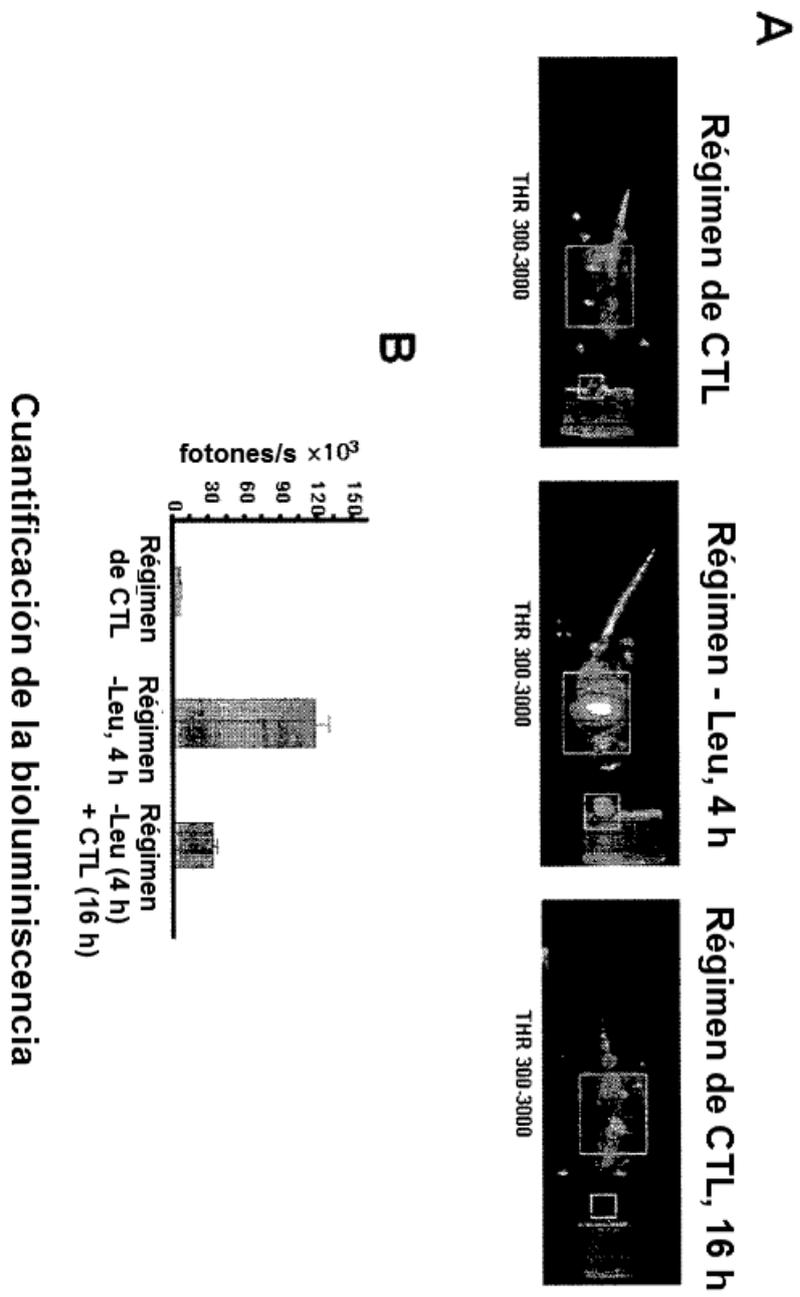


Figura 5