

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 907**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36	(2006.01)	C12N 15/86	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)		
C07K 14/755	(2006.01)		
C07K 14/81	(2006.01)		
C12N 15/864	(2006.01)		
A61K 38/48	(2006.01)		
C12N 15/85	(2006.01)		
C12N 15/52	(2006.01)		
C12N 15/63	(2006.01)		
C12N 9/64	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2009 PCT/EP2009/054724**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.10.2009 WO09130208**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2009 E 09735371 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2282764**

54 Título: **Elementos reguladores de ácido nucleico específicos de hígado y métodos y uso de los mismos**

30 Prioridad:

22.04.2008 US 125181 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2020

73 Titular/es:

**VIB VZW (33.3%)
Rijvisschestraat 120
9052 Gent, BE;
LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW
(33.3%) y
UNIVERSITEIT GENT (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CHUAH, MARINEE;
VANDENDRIESSCHE, THIERRY y
DE BLESER, PIETER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 746 907 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

Elementos reguladores de ácido nucleico específicos de hígado y métodos y uso de los mismos

5 **Campo**

La presente invención se refiere a elementos reguladores de ácido nucleico que pueden potenciar la expresión específica de hígado de genes, métodos que emplean estos elementos reguladores y usos de estos elementos. También se divulgan casetes de expresión y vectores que contienen estos elementos reguladores de ácido nucleico. La presente invención es particularmente útil para aplicaciones que usan genoterapia.

Antecedentes

El hígado cumple una gran diversidad de funciones esenciales en el organismo, incluyendo la síntesis de proteínas implicadas en el metabolismo, hemostasis y protección contra infecciones. Muchas enfermedades adquiridas, complejas y genéticas (enfermedades hepáticas en sentido estricto, así como algunos trastornos hereditarios que no dan lugar directamente a hepatopatía, pero se manifiestan en sí mismas principalmente en cualquier parte en el organismo) están asociadas con expresión génica alterada en el hígado. Algunos ejemplos incluyen hemofilia A o B, hipercolesterolemia familiar, deficiencia de ornitina transcarbamilasa o deficiencia de α -antitripsina. Además, el hígado a menudo cae presa de infecciones con patógenos (tales como virus de la hepatitis). Finalmente, el hígado puede experimentar transformación maligna y dar lugar a cáncer hepático (carcinoma hepatocelular) o degenerar funcionalmente como consecuencia de tratamientos farmacéuticos y quimioterapia, drogodependencia o alcoholismo. Por consiguiente, ha habido un interés sustancial y creciente en el uso de genoterapia para expresar un gen funcional en el hígado para reemplazar una proteína necesaria o para bloquear la expresión de un producto génico alterado o indeseado, por ejemplo, por interferencia de ARN o proteínas inhibidoras dominantes negativas, o de restaurar la función de los hepatocitos en un hígado en degeneración. La transducción de células hepáticas con genes apropiados, tales como citocinas inmunoestimuladoras, también puede ser útil para inducir respuestas inmunitarias contra, por ejemplo, hepatitis vírica o neoplasias hepáticas (Barajas *et al.*, 2001; Villa *et al.*, 2001).

Uno de los retos principales en la genoterapia hepática es conseguir expresión génica terapéutica hepatoespecífica (Xia *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2003). Abordar *in vivo* hepatocitos de mamífero se ha hecho inyectando ADN o vectores víricos en el parénquima hepático, la arteria hepática o la vena porta. Los vectores adenovíricos, incluso cuando se administran de forma sistémica, se dirigen principalmente al hígado en ratones (Wood *et al.*, 1999), pero también pueden infectar el pulmón y el músculo esquelético. Además, la especificidad hepática del adenovirus aún no se ha demostrado en seres humanos. Otros vectores, como los vectores víricos adenoasociados (AAV) o vectores lentivíricos, también pueden transducir hepatocitos, pero de nuevo puede producirse transducción de células no hepáticas que da lugar a expresión génica inespecífica (VandenDriessche *et al.*, 2002). Otro método para localizar la expresión génica es por dirección transcripcional. En general, la dirección transcripcional es muy deseable para todas las aplicaciones de genoterapia *in vivo* ya que puede evitar la expresión del transgén en células no diana, imitando de este modo la regulación fisiológica (Tenenbaum *et al.*, 2003; Schagen *et al.*, 2004). El uso de elementos transcripcionales específicos de hígado apropiados debe restringir la expresión de un gen terapéutico a los hepatocitos. Por ejemplo, algunos promotores que son activos principalmente en el hígado ya se han usado para suministro génico específico de célula (Kuriyama *et al.*, 1991; Kistner *et al.*, 1996). Sin embargo, la especificidad de tejido funcional se ha demostrado únicamente de forma infrecuente. Además, las desventajas principales para el uso de promotores específicos de hígado en genoterapia son el gran tamaño, ya que muchos vectores tienen un espacio de clonación restringido, y/o la baja actividad en comparación con los promotores fuertes (víricos), tal como secuencias promotoras de citomegalovirus (CMV) o de repetición terminal larga (LTR), ampliamente usadas en protocolos de genoterapia.

Es deseable una expresión transgénica específica de tejido creciente como una manera para disminuir la cantidad de vector vírico requerida para conseguir un efecto clínico. Para aumentar tanto la especificidad como la actividad, se ha propuesto el uso de elementos reguladores de acción *cis*. Típicamente, esto afecta a las secuencias potenciadoras, es decir, secuencias de ácido nucleico que aumentan la actividad de un promotor y que tienen el potencial de actuar *cis*, e independientemente de su orientación, incluso sobre distancias relativamente largas (hasta varias kilobases desde el promotor diana). Sin embargo, la función potenciadora no está restringida necesariamente a dichas distancias largas, ya que también pueden funcionar en cercana proximidad a un promotor dado. Para el hígado, se ha informado hasta ahora de numerosas estrategias para incorporar dichas secuencias reguladoras específicas de órgano en vectores retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos y víricos adenoasociados o vectores no víricos (a menudo además de promotores celulares específicos de hepatocitos constitutivos) (Ferry *et al.*, 1998; Ghosh *et al.*, 2000; Miao *et al.*, 2000; Follenzi *et al.*, 2002). Las ventajas de restringir la expresión génica mediada por vector a hepatocitos usando promotores y potenciadores específicos de hígado incluyen, por ejemplo, reducir la probabilidad de inducción de una respuesta inmunitaria a la proteína codificada por el transgén (Pastore *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2006, 2007). Se han documentado varias secuencias potenciadoras para genes específicos de hígado. Nathwani *et al.* (2006, Blood, 107 (7):2653-2661), describen un vector para genoterapia de hemofilia B (HB) mediada por AAV construyendo un minicasete de expresión del factor IX humano (hFIX) restringido al hígado que puede empaquetarse como dímeros complementarios dentro de partículas de AAV individuales. El documento

WO95/011308 describe un vector de genoterapia que comprende un potenciador de la región de control específica de hepatocitos (HCR) ligado a un promotor y un transgén. La región de control de apolipoproteína E-hepatocitos (ApoE-HCR) humana es una región de control de locus (LCR) para la expresión específica de hígado del gen de la apolipoproteína E (ApoE). La ApoE-HCR está ubicada en el locus de ApoE/CII/CIII, tiene una longitud total de 771 pb y es importante en la expresión de los genes ApoE y ApoC-II en el hígado (Simonet *et al.*, 1993). En el documento WO01/098482, se sugiere la combinación de esta secuencia potenciadora de ApoE específica o una versión truncada de la misma con promotores hepáticos. Se demostró que las construcciones de vector que combinan el potenciador de ApoE-HCR (no truncado) con un promotor de α -antitripsina (AAT) humano podían producir el máximo nivel de proteína terapéutica *in vivo* (Miao *et al.*, 2000) y pueden conferir expresión mantenida cuando se usan junto con un transgén heterólogo (Miao *et al.*, 2001). Cabe destacar que estos autores no solamente demuestran la importancia de las secuencias en *cis* para potenciar la expresión génica hepática *in vivo*, sino que también vuelven a enfatizar la ausencia de correlación de la expresión génica en cultivo tisular y estudios *in vivo*. Además, también en Roelvink *et al.* (documento US2006/189561) se proporcionó una expresión específica de hígado a partir del promotor de hAAT, unido de forma funcional al potenciador de ApoE y un transgén que codifica ARNip. También De Simone *et al.* (1987, EMBO J., 6: 2759-2766) se refiere a la caracterización de los elementos de acción en *cis* y *trans* en la región reguladora específica de hígado de α 1-antitripsina humana. Este casete de expresión de ApoE-HCR-AAT como se usa, por ejemplo, en la construcción pAAV-ApoHCR-AAT-FIXIA (VandenDriessche *et al.*, 2007) es una de las construcciones de expresión de FIX específicas de hígado más potentes conocidas, y se ha aplicado satisfactoriamente en un estudio clínico de aumento de dosis en fase 1/2 en seres humanos con hemofilia B grave (Manno *et al.*, 2006). La expresión de este minigén de hFIX está dirigida a partir de una ApoE-HCR unida al promotor de AAT humano. La secuencia flanqueante 5' del gen de AAT humano contiene múltiples elementos reguladores en *cis*, incluyendo un potenciador distal y secuencias proximales, con una longitud total de aproximadamente 1,2 kb. Se demostró que es suficiente para conferir especificidad tisular *in vivo* dirigir la expresión génica principalmente en el hígado y también, a un menor grado, en otros tejidos que se sabe que expresan AAT (Shen *et al.*, 1989). Un fragmento de 347 pb de esta región de 1,2 kb en combinación con el potenciador de ApoE puede conseguir expresión génica específica de hígado a largo plazo *in vivo* (Le *et al.*, 1997). De forma interesante, este promotor más corto dirige la expresión al hígado con una especificidad mayor que la presentada para fragmentos del promotor de AAT más grandes (Yull *et al.*, 1995).

También se han propuesto en la bibliografía otras construcciones específicas de hígado quiméricas, por ejemplo, con el promotor de AAT y los potenciadores de albúmina o hepatitis B (Kramer *et al.*, 2003), o el promotor basal de la alcohol deshidrogenasa 6 (ADH6) unido a dos copias en tándem del elemento potenciador de apolipoproteína E (Gehrke *et al.*, 2003). Los autores de la última publicación resaltan la importancia del tamaño relativamente pequeño (1068 pb) de esta combinación de potenciador-promotor.

Para poder proporcionar un nivel terapéutico del producto transgénico durante un periodo de tiempo prolongado, los vectores de transferencia génica preferiblemente permiten una alta expresión regulada específicamente, mientras que al mismo tiempo retienen suficiente espacio de clonación para el transgén a insertar, es decir, los elementos reguladores usados para conseguir la expresión elevada y específica de tejido preferiblemente son de longitud únicamente limitada. Sin embargo, ninguno de los vectores de genoterapia divulgados hasta ahora satisface todos estos criterios. En su lugar, los vectores de genoterapia no son suficientemente robustos en términos de niveles de expresión y/o especificidad de expresión en las células diana deseadas, particularmente el hepatocito. Disminuir el tamaño de promotor/potenciador a menudo compromete los niveles de expresión y/o la especificidad de expresión mientras que el uso de secuencias más grandes a menudo compromete la eficacia del suministro génico debido a una alteración de la función del vector, la eficacia de empaquetado y/o transfección/transducción. Por tanto, hay una necesidad en la técnica de vectores que consigan niveles terapéuticos de expresión transgénica en el hígado para genoterapia eficaz.

Sumario

Un objeto de la presente divulgación es aumentar la eficacia de la expresión específica de hígado de construcciones usadas para genoterapia, particularmente *in vivo*. Al mismo tiempo, un objeto de la invención es conseguir esto usando construcciones con un alto grado de compactación estructural.

El objetivo anterior se consigue proporcionando elementos reguladores específicos que potencian la expresión del promotor, mientras que retienen la especificidad de tejido (incluso cuando se usan promotores mínimos). Es de particular importancia el pequeño tamaño de estos elementos reguladores, que hace posible acomodar esta unidad de control transcripcional en cualquier tipo de vector vírico o no vírico, incluso junto con genes efectores grandes. A pesar de su longitud limitada, los elementos reguladores proporcionados en este documento pueden potenciar la expresión de un transgén hasta niveles similares y típicamente incluso mayores en comparación con los casetes de expresión de ácido nucleico más largos tradicionales usados en genoterapia.

Por tanto, de acuerdo con un primer aspecto, se proporcionan elementos reguladores de ácido nucleico de 600 nucleótidos o menos para potenciar la expresión génica específica de hígado, que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID

NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, o una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias.

5 De acuerdo con un elemento adicional de la memoria descriptiva, el elemento regulador de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

10 De acuerdo con una realización alternativa, se divulga un elemento regulador de ácido nucleico de 90 nucleótidos o menos que hibrida en condiciones rigurosas con el elemento regulador que comprende la SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.

15 De acuerdo con una realización alternativa adicional, se proporcionan elementos reguladores de ácido nucleico de 600 nucleótidos o menos, que comprenden al menos dos fragmentos de secuencias seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, y una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias. De acuerdo con una realización particular alternativa, al menos dos fragmentos son idénticos.

20 En un aspecto adicional, los elementos reguladores se usan para expresar genes o transgenes. Por consiguiente, se proporcionan casetes de expresión de ácido nucleico que comprenden un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en este documento, unido de forma funcional a un promotor. De acuerdo con una realización adicional de este aspecto, el elemento regulador de ácido nucleico en los casetes de expresión de ácido nucleico está unido de forma funcional a un promotor y un transgén.

25 De acuerdo con un elemento específico de la memoria descriptiva, los casetes de expresión de ácido nucleico se proporcionan con dos o más elementos reguladores de ácido nucleico. Estos dos o más elementos reguladores de ácido nucleico entonces están unidos de forma funcional al promotor, y opcionalmente el transgén. De acuerdo con un elemento específico adicional de la memoria descriptiva, al menos dos de los dos o más elementos reguladores son idénticos o sustancialmente idénticos (por ejemplo, un 90 % o un 95 % idénticos). De acuerdo con otro elemento específico adicional de la memoria descriptiva, todos de los dos o más elementos reguladores son idénticos o sustancialmente idénticos. De acuerdo un elemento alternativo de la memoria descriptiva, al menos dos de los dos o más elementos reguladores no son idénticos entre sí.

35 De acuerdo con un elemento particular de la memoria descriptiva, el promotor contenido en los casetes de expresión de ácido nucleico proporcionados es un promotor específico de hígado. De acuerdo con una realización particular adicional, el promotor específico de hígado es del gen de transtiretina (TTR). De acuerdo con otra realización particular adicional, el promotor de TTR es un promotor mínimo, muy particularmente un promotor mínimo como se define en la SEQ ID NO: 17.

40 De acuerdo con otra realización particular, el promotor contenido en los casetes de expresión de ácido nucleico proporcionados es un promotor mínimo.

45 El transgén que puede estar contenido en el casete de expresión de ácido nucleico típicamente codifica un producto génico tal como ARN o un polipéptido (proteína). De acuerdo con un elemento de la memoria descriptiva, el transgén codifica una proteína terapéutica. De acuerdo con una realización específica adicional, la proteína terapéutica es un factor de coagulación. De acuerdo con una realización específica adicional más, la proteína terapéutica (o factor de coagulación) es el factor IX.

50 El casete de expresión de ácido nucleico, e incluso el elemento regulador, como se describe en este documento, puede usarse tal cual. Sin embargo, en realizaciones típicas, el casete de expresión será parte de un vector de ácido nucleico. Por consiguiente, en un aspecto adicional se proporcionan vectores que comprenden el elemento regulador como se describe en este documento. De acuerdo con una realización particular, los vectores comprenden el casete de expresión de ácido nucleico que se divulga en la solicitud.

55 De acuerdo con una realización específica, los vectores proporcionados son vectores víricos, en particular vectores retrovíricos, lentivíricos, adenovíricos o AAV, más en particular vectores lentivíricos o AAV. De acuerdo con una realización alternativa, los vectores son vectores no víricos. De acuerdo con otra realización alternativa más, los vectores contienen tanto elementos víricos como no víricos.

60 Es evidente para los expertos en la materia que los elementos reguladores específicos de hígado, los casetes de expresión de ácido nucleico y los vectores que contienen alguno de ellos pueden usarse con fines de genoterapia. Por consiguiente, se prevé el uso del elemento regulador de ácido nucleico como se describe en este documento en genoterapia. De acuerdo con otra realización particular, se divulga el uso del casete de expresión de ácido nucleico divulgado en este documento en genoterapia. De acuerdo con otra realización particular adicional, la solicitud prevé el uso de vectores como se divulga en este documento para genoterapia. De acuerdo con un elemento particular de la memoria descriptiva, la genoterapia prevista es genoterapia específica de hígado. De acuerdo con otro elemento particular de la memoria descriptiva, la genoterapia es geoterapia para una enfermedad originada en el hígado.

De acuerdo con un aspecto adicional de la memoria descriptiva, se proporcionan métodos para expresar un producto transgénico en células hepáticas, que comprenden las etapas de

- 5
 - introducir en células hepáticas el casete de expresión de ácido nucleico en el que un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en este documento está unido de forma funcional o un promotor y un transgén;
 - expresar el producto transgénico en las células hepáticas.

- 10 De acuerdo con un elemento particular adicional de la memoria descriptiva, el producto transgénico es una proteína, de acuerdo con otro elemento particular adicional de la memoria descriptiva, la proteína es una proteína terapéutica. De acuerdo con un elemento alternativo de la memoria descriptiva, el producto transgénico es ARN. De acuerdo con otro elemento particular de la memoria descriptiva los métodos se realizan *in vitro*. De acuerdo con un elemento particular alternativo de la memoria descriptiva, los métodos se realizan *ex vivo*. De acuerdo con un elemento
- 15 particular alternativo de la memoria descriptiva, los métodos se realizan *in vivo*.

También se proporcionan en este documento métodos de genoterapia para un sujeto que lo necesita. Estos métodos típicamente comprenden las etapas de:

- 20
 - introducir en el hígado del sujeto un casete de expresión de ácido nucleico en el que un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en este documento está unido de forma funcional o un promotor y un transgén que codifica una proteína terapéutica;
 - expresar una cantidad terapéutica de la proteína (terapéutica) en el hígado.
- 25 En lugar de introducir el casete de expresión de ácido nucleico tal cual, los métodos también pueden introducir en el hígado del sujeto un vector que contiene un casete de expresión de ácido nucleico en el que un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en este documento está unido de forma funcional a un promotor y un transgén que codifica una proteína terapéutica.
- 30 En general, el sujeto que lo necesita será un mamífero, muy particularmente un ser humano. Típicamente, el sujeto que lo necesita tendrá determinados síntomas, muy particularmente síntomas característicos de una enfermedad. De acuerdo con un elemento adicional de la memoria descriptiva, los métodos comprenden adicionalmente la etapa de mejorar los síntomas del sujeto que lo necesita, expresando la cantidad terapéutica de la proteína terapéutica.
- 35 De acuerdo con un elemento particular de la memoria descriptiva, los métodos pueden usarse para el tratamiento de un sujeto con hemofilia B. De acuerdo con este elemento de la memoria descriptiva, los métodos comprenden las etapas de:
- 40
 - introducir en el hígado del sujeto un casete de expresión de ácido nucleico en el que un elemento regulador de ácido nucleico como se describe en este documento está unido de forma funcional a un promotor y un transgén que codifica un factor de coagulación, en particular factor IX, o un vector que comprende dicho casete de expresión de ácido nucleico;
 - expresar una cantidad terapéutica del factor de coagulación (en particular factor IX) en el hígado.
- 45 Estos métodos pueden comprender además la etapa de mejorar los síntomas de hemofilia B expresando la cantidad terapéutica el factor de coagulación (en particular factor IX) en el hígado.

Breve descripción de las figuras

- 50 La **figura 1** muestra un diagrama esquemático de la construcción pAAV-TTRmin(E)-FIXIA con indicación donde se insertan los diferentes potenciadores específicos de hígado en dirección 5' del promotor mínimo de transtiretina. Los nombres y abreviaturas de los potenciadores se enumeran en la tabla debajo de la construcción. Las abreviaturas usadas son: ITR: repetición terminal invertida vírica; TTRmin: promotor mínimo de transtiretina; primer exón de FIX: primer exón del gen del factor IX humano; Intrón A: fragmento de 1,4 kb del primer intrón del gen del factor IX humano; hFIX: exones 2 a 8 del gen del factor IX humano; 3'UTR: región no traducido 3' del gen del factor IX humano, truncado en 70 pb; bGHpA: señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina.
- 55

- La **figura 2** es un diagrama esquemático de construcciones pAAV-TTRmin(E)n-FIXIA que contienen repeticiones de potenciador específico de hígado en dirección 5' del promotor mínimo de transtiretina. A1x2: dos copias del potenciador de ApoC4 (SEQ ID NO: 4); Serpx3: tres copias de la secuencia del potenciador 3 de serpin1 (SEQ ID NO: 3); S2x6: seis copias de la secuencia del potenciador 2 de serpin1 (SEQ ID NO: 2). Otras abreviaturas son iguales que en la figura 1.
- 60

- La **figura 3** detalla la validación *in vivo* de potenciadores específicos de hepatocitos. La expresión del factor IX (FIX) se determinó usando un ELISA específico de FIX humano 2 días después de la transfección tras el suministro
- 65

génico hidrodinámico de 2 µg de ADN plasmídico en ratones C57Bl/6 adultos. Para las abreviaturas de los potenciadores véase la tabla III. El potenciador de Serp (SEQ ID NO: 3) se indica con flecha.

La **figura 4** muestra la validación *in vivo* de secuencias del potenciador 3 de *serpina1* de repetición de triplete (SEQ ID NO: 3). La expresión del factor IX (FIX) se determinó usando un ELISA específico de FIX humano 24 o 48 h después de la transfección tras el suministro génico hidrodinámico de 0,5, 1 o 2 µg (según se indique) de ADN plasmídico en ratones C57Bl/6 adultos. TTR min: construcción con el promotor mínimo de transtretina sin potenciador; Serp3: construcción con secuencias del potenciador 3 de *serpina1* de repetición de triplete (SEQ ID NO: 3) como se muestra en la figura 2; ApoE-HCR-AAT: construcción que combina el potenciador de ApoE y el promotor de AAT, como se describe previamente (Miao *et al.*, 2000).

La **figura 5** muestra la expresión de FIX después de inyección intravenosa de AAV9-TTRminSerp-FIXIA (círculos) y AAV9-TTRmin-FIXIA (cuadrados) en ratones C57Bl/6 (n= 3-5). Los niveles de expresión de hFIX se determinaron por ELISA en plasma con citrato recogido a diferentes intervalos de tiempo (dpi: días después de la infección).

La **figura 6** muestra que la expresión de ARNm de FIX humano (hFIX) está restringida exclusivamente al hígado, mientras que el gen de FIX no se expresaba en ningún otro tejido (tras inyección con 3×10^{12} genomas de vector). **A.** RT-qPCR sobre ARN total de diferentes órganos de ratones a los que se ha inyectado AAV9-TTRminSerp-FIXIA. El gen constitutivo de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa murina (mGAPDH) se usa como control para expresión génica cuantitativa. **B.** Número de copias de ARNm de hFIX relativo en diferentes órganos determinado por RT-qPCR (con respecto al número de copias de ARNm de hFIX en hígado).

Descripción detallada

Definiciones

La divulgación se describirá con respecto a elementos particulares de esta memoria descriptiva y con referencia a determinados dibujos, pero la invención no está limitada a ello, sino solamente por las reivindicaciones. Cualquier signo de referencia en las reivindicaciones no debe interpretarse como limitante de alcance. Los dibujos descritos son únicamente esquemáticos y no son limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede estar exagerado y no estar dibujado a escala con fines ilustrativos. Cuando se usa el término "comprendiendo" en la presente descripción y las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Cuando se usa un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un sustantivo singular, por ejemplo, "uno" o "una", "el/la", esto incluye un plural del sustantivo salvo que se indique específicamente algo más.

Además, los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así usados son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención y los elementos de la memoria descriptiva descritos en este documento pueden funcionar en otras secuencias a las descritas o ilustradas en este documento.

Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para ayudar a comprender la divulgación. Salvo que se defina específicamente en este documento, todos los términos usados en este documento tienen el mismo significado que el que tendría para un experto en la materia de la presente invención. Se remite a los facultativos particularmente a Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, Nueva York (1989); y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999), para definiciones y términos de la técnica. No debe interpretarse que las definiciones proporcionadas en este documento tengan un alcance menor al comprendido por un experto en la materia.

Un "elemento regulador", como se usa en este documento, se refiere a elementos de control transcripcional, en particular elementos de control transcripcional de acción en *cis* no codificantes, que pueden regular y/o controlar la transcripción de un gen, en particular la transcripción específica de tejido de un gen. Los elementos reguladores comprenden al menos un sitio de unión a factor de transcripción (TFBS), más en particular al menos un sitio de unión para un factor de transcripción específico de tejido, más particularmente al menos un sitio de unión para un factor de transcripción específico de hígado. Típicamente, los elementos reguladores que se usan en este documento aumentan o potencian la expresión génica dirigida por promotor en comparación con la transcripción del gen a partir del promotor en solitario, sin los elementos reguladores. Por tanto, los elementos reguladores comprenden particularmente secuencias potenciadoras, aunque debe entenderse que los elementos reguladores que potencian la transcripción no están limitados a secuencias potenciadoras lejos en dirección 5' típicas, sino que pueden existir a cualquier distancia del gen que regulan. De hecho, se sabe en la técnica que secuencias que regulan la transcripción pueden estar situadas en dirección 5' (por ejemplo, en la región promotora) o en dirección 3' (por ejemplo, en la 3'UTR) del gen que regulan *in vivo*, y pueden estar ubicadas en las cercanías inmediatas del gen o más lejos. Cabe destacar que, aunque los elementos reguladores que se divulgan en este documento típicamente son secuencias de origen natural, combinaciones de (partes de) dichos elementos reguladores o varias copias de un elemento regulador, es decir, secuencias de origen no natural, también se prevén por sí mismas como elemento regulador. Los elementos reguladores como se usan en este documento pueden ser parte de una secuencia más

grande implicada en el control transcripcional, por ejemplo, parte de una secuencia promotora. Sin embargo, los elementos reguladores en solitario típicamente no son suficiente para iniciar la transcripción, sino que requieren un promotor para este fin.

La "expresión específica de hígado", como se usa en la memoria descriptiva, se refiere a la expresión preferente o predominante de un gen o (trans)gen (como ARN y/o polipéptido) en el hígado en comparación con otros tejidos. De acuerdo con elementos particulares de la memoria descriptiva, al menos un 50 % de la expresión del gen o (trans)gen se produce dentro del hígado. De acuerdo con elementos más particulares de la memoria descriptiva, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 99 % o un 100 % de la expresión del gen o (trans)gen se produce dentro de hígado. De acuerdo con elementos particulares de la memoria descriptiva, la expresión específica de hígado implica que no hay "filtración" del producto génico expresado a otros órganos, tal como el bazo, músculo, corazón y/o pulmón. Lo mismo se aplica *mutatis mutandis* para la expresión específica de hepatocitos, que puede considerarse una forma particular de expresión específica de hígado. Durante toda la memoria descriptiva, cuando se menciona específico de hígado en el contexto de la expresión, la expresión específica de hepatocitos también se prevé de forma explícita. Asimismo, cuando se usa expresión específica de tejido en la memoria descriptiva, también se prevé la expresión específica de tipo celular del tipo o tipos celulares que componen predominantemente el tejido.

La expresión "fragmento funcional", como se usa en este documento, se refiere a fragmentos de las secuencias divulgadas en este documento que retienen la capacidad de regular la expresión específica de hígado, es decir, aún confieren especificidad tisular y pueden regular la expresión de un gen o (trans)gen de la misma manera (aunque posiblemente no al mismo grado) que la secuencia de la que derivan. Los fragmentos comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de la secuencia de la que derivan. En realizaciones particulares adicionales, los fragmentos comprenden al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 nucleótidos contiguos de la secuencia de la que derivan.

La expresión "hibrida en condiciones rigurosas", y equivalentes gramaticales de la misma, se refiere a la capacidad de una molécula de ácido nucleico de hibridar con una molécula de ácido nucleico diana en condiciones definidas de temperatura y concentración salina. Típicamente, las condiciones de hibridación rigurosa son de no más de 25 °C a 30 °C (por ejemplo, 20 °C, 15 °C, 10 °C o 5 °C) por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de la doble hélice nativa. Los métodos de cálculo de la T_m son bien conocidos en la técnica. A modo de ejemplo no limitante, condiciones representativas de sal y temperatura para conseguir hibridación rigurosa son: SSC1x, SDS al 0,5 % a 65 °C. La abreviatura SSC se refiere aún tampón usado en soluciones de hibridación de ácido nucleico. Un litro de la solución madre de tampón SSC (pH 7,0) 20X (concentrada veinte veces) contiene 175,3 g de cloruro de sodio y 88,2 g de citrato de sodio. Un periodo de tiempo representativo para conseguir hibridación es 12 horas. (Véase en general, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing, 1987).

Como se usa en este documento, la expresión "casete de expresión de ácido nucleico" se refiere a moléculas de ácido nucleico que incluyen uno o más elementos de control transcripcional (tal como, aunque sin limitación, promotores, potenciadores y/o elementos reguladores, secuencias de poliadenilación e intrones) que dirigen la expresión del gen o (trans)gen en uno o más tipos celulares, tejidos y órganos deseados. Típicamente, también contendrán un transgén, aunque se prevé que un casete de expresión de ácido nucleico dirija la expresión de un gen endógeno en una célula en que se inserta la secuencia de ácido nucleico.

La expresión "unido de forma funcional", como se usa en este documento, se refiere a la disposición de diversos elementos moleculares de ácido nucleico unos con respecto a otros de modo que los elementos estén conectados de forma funcional y puedan interactuar entre sí. Dichos elementos pueden incluir, sin limitación, un promotor, un potenciador y/o un elemento regulador, una secuencia de poliadenilación, uno o más intrones y/o exones y una secuencia codificante de un gen de interés a expresar (es decir, el transgén). Los elementos de secuencia de ácido nucleico, cuando están orientados apropiadamente o unidos de forma funcional, actúan conjuntamente para modular la actividad de otro, y finalmente pueden afectar al nivel de expresión del transgén. Por modular se entiende aumentar, disminuir o mantener el nivel de actividad de un elemento particular. La posición de cada elemento con respecto a otros elementos puede expresarse en términos del extremo 5' o el extremo 3' de cada elemento, y la distancia entre cualquier elemento particular puede mencionarse por el número de nucleótidos intermedios, o pares de bases, entre los elementos.

Como se usa en la memoria descriptiva, el término "promotor" se refiere a secuencias de ácido nucleico que regulan, directa o indirectamente, la transcripción de secuencias codificante de ácido nucleico correspondientes a las que están unidas de forma funcional (por ejemplo, un transgén o gen endógeno). Un promotor puede funcionar en solitario regulando la transcripción o puede actuar en concierto con una o más secuencias reguladoras diferentes (por ejemplo, potenciadores o silenciadores). En el contexto de la presente solicitud, un promotor está unido típicamente de forma funcional a elementos reguladores que regula la transcripción de un transgén. Cuando un elemento regulador como se describe en este documento está unido de forma funcional tanto a un promotor como a un transgén, el elemento regulador puede (1) conferir un grado significativo de expresión específica de hígado *in vivo* (y/o en hepatocitos/líneas de células hepática *in vitro*) del transgén, y/o (2) aumentar el nivel de expresión de un

transgén en el hígado (y/o en hepatocitos/líneas celulares de hepatocitos *in vitro*). Un "promotor mínimo", como se usa en este documento, es parte de un promotor de tamaño completo aún capaz de dirigir la expresión, pero que carece de al menos parte de la secuencia que contribuye a regular (por ejemplo, específica de tejido) la expresión. Esta definición cubre tanto promotores de los que se han eliminado elementos reguladores (específicos de tejido), que pueden dirigir la expresión de un gen, pero han perdido su capacidad de expresar ese gen de una manera específica de sitio como promotores de los que se han eliminado elementos reguladores (específicos de tejido que pueden dirigir (posiblemente disminuida) la expresión de un gen, pero no han perdido necesariamente su capacidad de expresar ese gen de una manera específica de tejido. Se han documentado ampliamente en la técnica los promotores mínimos, se proporciona una lista no limitante de promotores mínimos en la memoria descriptiva.

El término "transgén", como se usa en este documento se refiere a secuencias de ácido nucleico particulares que codifican un polipéptido o una parte de un polipéptido a expresar en una célula en que se inserta la secuencia de ácido nucleico. Sin embargo, también es posible que se expresen transgenes como ARN, típicamente para reducir la cantidad de un polipéptido particular en una célula en que se inserta la secuencia de ácido nucleico. Estas moléculas de ARN incluyen, aunque sin limitación, moléculas que ejercen su función mediante interferencia de ARN (ARNhc, iARN), regulación por micro-ARN (miR), ARN catalítico, ARN de antisentido, aptámeros de ARN, etc. La manera en que se introduce la secuencia de ácido nucleico en una célula no es esencial para la invención, puede ser, por ejemplo, mediante integración en el genoma o como un plásmido episómico. Cabe destacar que la expresión del transgén puede restringirse a un subconjunto de las células en que se inserta la secuencia de ácido nucleico. Se entiende que el término "transgén" incluye (1) una secuencia de ácido nucleico que no se encuentra de forma natural en la célula (es decir, una secuencia de ácido nucleico heteróloga); (2) una secuencia de ácido nucleico que es una forma mutante de una secuencia de ácido nucleico encontrada de forma natural en la célula en que se ha introducido; (3) una secuencia de ácido nucleico que sirve para añadir copias adicionales de la misma secuencia de ácido nucleico (es decir, homóloga) o una similar que se produce de forma natural en la célula en que se ha introducido; o (4) una secuencia de ácido nucleico inactiva de origen natural u homóloga cuya expresión se induce en la célula en que se ha introducido. Por "forma mutante" se entiende una secuencia de ácido nucleico que contiene uno o más nucleótidos que son diferentes de la secuencia de tipo silvestre o de origen natural, es decir, la secuencia de ácido nucleico mutante contiene una o más sustituciones, eliminación y/o inserciones de nucleótidos. En algunos casos, el transgén también puede incluir una secuencia que codifica un péptido líder o secuencia señal de modo que el producto transgénico se secretará de la célula.

El término "vector", como se usa en la memoria descriptiva, se refiere a moléculas de ácido nucleico, habitualmente ADN bicatenario, que puede haberse insertado en otra molécula de ácido nucleico (la molécula de ácido nucleico insertada) tal como, aunque sin limitación, una molécula de ADNc. El vector se usa para transportar la molécula de ácido nucleico insertada en una célula hospedadora adecuada. Un vector puede contener los elementos necesarios que permiten transcribir la molécula de ácido nucleico insertada y, opcionalmente, traducir el transcrito en un polipéptido. La molécula de ácido nucleico insertada puede obtenerse de la célula hospedadora, o puede obtenerse de una célula u organismo diferente. Una vez en la célula hospedadora, el vector puede replicarse independientemente de, o de forma coincidente con, el ADN cromosómico hospedador, y pueden generarse varias copias del vector y su molécula de ácido nucleico insertada. El término "vector", por tanto, también puede definirse como un vehículo de suministro génico que facilita la transferencia génica en una célula diana. Esta definición incluye tanto vectores no víricos como víricos. Los vectores no víricos incluyen, aunque sin limitación, lípidos catiónicos, liposomas, nanopartículas, PEG, PEI, etc. Los vectores víricos se obtienen de virus e incluyen, aunque sin limitación, vectores retrovíricos, lentivíricos, víricos adenoasociados, adenovíricos, herpesvíricos, del virus de la hepatitis o similares. Típicamente, aunque no necesariamente, los vectores víricos son deficientes en la replicación ya que han perdido la capacidad de propagarse en una célula dada ya que los genes víricos esenciales para la replicación se han eliminado del vector vírico. Sin embargo, algunos vectores víricos también pueden adaptarse para replicarse específicamente en una célula dada, tal como, por ejemplo, una célula cancerosa, y se usan típicamente para activar la (onco)lisis específica de célula (cáncer).

De acuerdo con un primer aspecto de la memoria descriptiva, se proporcionan elementos reguladores de ácido nucleico para potenciar la expresión génica específica de hígado de 600 nucleótidos o menos, que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14. De acuerdo con un elemento específico de la memoria descriptiva, los elementos reguladores de ácido nucleico comprenden una secuencia que tiene un 80 % de identidad de secuencia, más en particular un 85 % de identidad de secuencia, incluso más en particular un 90 % de identidad de secuencia, incluso aún más en particular un 95 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de estas secuencias. De acuerdo con otro elemento específico de la memoria descriptiva, los elementos reguladores de ácido nucleico comprenden un fragmento funcional de estas secuencias (o de las secuencias que comparten un alto porcentaje de identidad de secuencia con estas secuencias). La manera en que se identifican las secuencias implicadas en la expresión génica específica de hígado se resume en la sección de ejemplos.

Es un beneficio considerable que los elementos reguladores como se describe en este documento sean completamente funcionales mientras tengan únicamente longitud limitada. Esto permite su uso en vectores o casetes de expresión de ácido nucleico sin restringir excesivamente su capacidad de carga. Por consiguiente, los

elementos reguladores de ácido nucleico son de 600 nucleótidos o menos de longitud, 550 nucleótidos o menos, 500 nucleótidos o menos, 450 nucleótidos o menos, 400 nucleótidos o menos, 350 nucleótidos o menos, 300 nucleótidos o menos, 250 nucleótidos o menos, 200 nucleótidos o menos, 175 nucleótidos o menos, incluso más en particular 150 nucleótidos o menos, 125 nucleótidos o menos, 110 nucleótidos o menos, incluso aún más en particular de 100 nucleótidos o menos, 90 nucleótidos o menos, 80 nucleótidos o menos, 75 nucleótidos o menos, 70 nucleótidos o menos, 65 nucleótidos o menos, 60 nucleótidos o menos, 55 nucleótidos o menos, 50 nucleótidos o menos. Sin embargo, debe entenderse que los elementos reguladores de ácido nucleico divulgados retienen actividad reguladora (es decir, con respecto a la especificidad y/o actividad de transcripción) y, por tanto, tiene particularmente una longitud mínima de 20 nucleótidos, 25 nucleótidos, 30 nucleótidos, 35 nucleótidos, 40 nucleótidos, 45 nucleótidos o 50 nucleótidos.

Además, de acuerdo con elementos particulares de la memoria descriptiva, los elementos reguladores de ácido nucleico de 600 nucleótidos o menos para potenciar la expresión génica específica de hígado consisten esencialmente en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias o un fragmento funcional de las mismas. Es decir, el elemento regulador puede comprender adicionalmente, por ejemplo, secuencias usadas con fines de clonación (véase, para un ejemplo arbitrario, las secuencias proporcionadas como las SEQ ID 18-31), pero las secuencias mencionadas anteriormente componen la parte esencial del elemento regulador, por ejemplo, no forman parte de una región reguladora más grande tal como un promotor. De acuerdo con un elemento particular adicional de la memoria descriptiva, los elementos reguladores de ácido nucleico de 600 nucleótidos o menos para potenciar la expresión génica específica de hígado consisten en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias o un fragmento funcional de las mismas.

Las secuencias de ácido nucleico pueden proporcionarse como ADN o ARN, como molécula bicatenaria o monocatenaria. En caso de que la secuencia se proporcione como ácidos nucleicos monocatenarios, la hebra complementaria se considera equivalente a las SEQ ID divulgadas, y también se prevé para su uso en las construcciones de ácido nucleico y métodos y usos de los mismos descritos en este documento. Por tanto, de acuerdo con una realización específica, los elementos reguladores de ácido nucleico comprenden la hebra complementaria de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias o un fragmento funcional de las mismas. De acuerdo con una realización específica adicional, los elementos reguladores consisten esencialmente en la hebra complementaria de las secuencias mencionadas anteriormente. De acuerdo con otra realización específica adicional, los elementos reguladores consisten en la hebra complementaria de las secuencias enumeradas.

Además, se prevé que también pueden usarse secuencias que hibridan con las secuencias enumeradas en este documento, en particular que hibridan con el complemento de las secuencias divulgadas en este documento, como elementos reguladores de ácido nucleico. Con hibridación se entiende típicamente "hibridación en condiciones rigurosas". Las secuencias que hibridan con las secuencias enumeradas no tienen que ser de la misma longitud que la secuencia con la que hibridan. Sin embargo, debe apreciarse que estas secuencias de hibridación, a usar como elementos reguladores de ácido nucleico, particularmente no exceden el límite de tamaño para los elementos reguladores como se describe en este documento. Además, de acuerdo con un elemento específico de la memoria descriptiva, el tamaño del ácido nucleico que hibrida con la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias o un fragmento funcional de las mismas, no difiere más de un 25 % en la longitud, en particular un 20 % en la longitud, más en particular un 15 % en la longitud, mucho más en particular no más de un 10 % en la longitud de la secuencia con la que hibrida.

Varias de las secuencias divulgadas en este documento son de longitud muy limitada; algunas también son considerablemente más cortas que otras. Por tanto, particularmente para las secuencias más cortas, es posible generar un elemento regulador que comprenda dos o más copias de la misma secuencia, o incluso dos secuencias diferentes de las secuencias enumeradas. Aunque es posible, por supuesto, combinar de forma modular las secuencias (o copias de la misma secuencia) para todas las secuencias, se prevé particularmente que esas combinaciones de secuencias no excedan el tamaño del elemento regulador como se define en este documento, es decir, no excedan de 600 nucleótidos (o más en particular no excedan de 400 nucleótidos o incluso más en particular no excedan de 300 o 250 nucleótidos).

De acuerdo con un elemento muy específico de la memoria descriptiva, los elementos reguladores de ácido nucleico divulgados en este documento comprenden al menos dos fragmentos funcionales de las secuencias enumeradas, combinados para generar una nueva (artificial) secuencia reguladora. De acuerdo con un elemento específico adicional de la memoria descriptiva, estos al menos dos fragmentos funcionales son fragmentos no idénticos. De

acuerdo con un elemento alternativo de la memoria descriptiva, al menos dos de los al menos dos fragmentos funcionales son idénticos entre sí. De acuerdo con otro elemento muy específico de la memoria descriptiva, dos fragmentos de las secuencias enumeradas, al menos uno de los cuales no es funcional tal cual, se combinan para generar una nueva (artificial) secuencia reguladora.

Las secuencias divulgadas en este documento son secuencias reguladoras que controlan la transcripción de genes específicos de hígado *in vivo*, en particular que controlan los siguientes genes: inhibidor de serpina peptidasa, miembro 1 de clado A, también conocido como α -antitripsina (SERPINA1; GenelD 5265), apolipoproteína C-I (APOC1; GenelD 341), apolipoproteína C-IV (APOC4; GenelD 346), apolipoproteína H (APOH; GenelD 350); transtiretina (TTR; GenelD 7276), albúmina (ALB; GenelD 213), aldolasa B (ALDOB; GenelD 229), citocromo P450, polipéptido 1 de subfamilia E de familia 2 (CYP2E1; GenelD 1571), cadena alfa de fibrinógeno (FGA; GenelD 2243), transferrina (TF; GenelD 7018), proteína relacionada con haptoglobina (HPR; GenelD 3250). De acuerdo con un elemento específico de la memoria descriptiva, los elementos reguladores comprenden elementos reguladores de SERPINA1, es decir, elementos reguladores que controlan la expresión del gen de SERPINA1 *in vivo*. De acuerdo con un elemento específico adicional de la memoria descriptiva, los elementos reguladores comprenden secuencias reguladoras de SERPINA1 seleccionadas de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2. De acuerdo con otra realización específica adicional, el elemento regulador comprende la SEQ ID NO: 3.

Los elementos reguladores de ácido nucleico divulgados en este documento pueden usarse en un casete de expresión de ácido nucleico. Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la memoria descriptiva, se proporciona casetes de expresión de ácido nucleico en los que un elemento regulador como se describe en este documento está unido de forma funcional a un promotor. De acuerdo con un elemento adicional de la memoria descriptiva, el elemento regulador está unido de forma funcional a un promotor y un transgén.

Como entiende un experto en la materia, unido de forma funcional implica actividad funcional, y no está necesariamente relacionado con una vinculación posicional natural. De hecho, cuando se usan en casetes de expresión de ácido nucleico, los elementos reguladores típicamente estarán ubicados inmediatamente en dirección 5' del promotor (aunque este es generalmente el caso, definitivamente no debe interpretarse como una limitación o exclusión de posiciones dentro del casete de expresión de ácido nucleico), pero este no tiene que ser el caso *in vivo*. Por ejemplo, una secuencia de elemento regulador de origen natural en dirección 3' de un gen a cuya transcripción afecta puede funcionar de la misma manera cuando está ubicado en dirección 5' del promotor. Por tanto, de acuerdo con un elemento específico de la memoria descriptiva, el efecto regulador o potenciador de las secuencias reguladoras es independiente de la posición. Además, las secuencias reguladoras pueden ejercer su efecto sobre la expresión independiente de secuencias promotoras o génicas particulares.

Por tanto, pueden usarse en casetes de expresión de ácido nucleico junto con su promotor natural, así como con otro promotor. En particular, los elementos reguladores pueden dirigir la expresión específica de tejido incluso a partir de un promotor que por sí mismo no es específico de hígado (o carece de elementos que contribuyen a hacerlo específico de hígado, en el caso de promotores mínimos). Sin embargo, también pueden usarse promotores específicos de hígado, por supuesto, para aumentar la especificidad de hígado y/o evitar la filtración de expresión en otros tejidos. El promotor específico de hígado puede ser o no un promotor específico de hepatocitos. El promotor no tiene que ser el promotor del transgén en el casete de expresión de ácido nucleico, aunque es posible que el transgén se transcriba a partir de su propio promotor. De acuerdo con un elemento particular de la memoria descriptiva, el casete de expresión de ácido nucleico se usa para genoterapia. De acuerdo con este elemento de la memoria descriptiva, el promotor puede ser homólogo (es decir, de la misma especie que el animal (en particular mamífero) a transfectar con el casete de expresión de ácido nucleico) o heterólogo (es decir, de una fuente distinta de la especie del mamífero a transfectar con el casete de expresión). Por tanto, la fuente del promotor puede ser cualquier organismo unicelular procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, o puede incluso ser un promotor sintético (es decir, que tiene una secuencia de origen no natural), con la condición de que el promotor sea funcional en combinación con los elementos reguladores descritos en este documento. De acuerdo con un elemento específico de la memoria descriptiva, el promotor es un promotor de mamífero, en particular un promotor murino o humano. De acuerdo con un elemento específico adicional de la memoria descriptiva, el promotor es un promotor específico de hígado de mamífero. De acuerdo con otro elemento específico adicional de la memoria descriptiva, el promotor es un promotor específico de hígado humano. De acuerdo con un elemento alternativo de la memoria descriptiva, el promotor es un promotor vírico. De acuerdo con un elemento adicional de la memoria descriptiva, el promotor vírico es un promotor vírico específico de hígado. El promotor puede ser un promotor inducible o constitutivo.

Para minimizar la longitud del casete de expresión de ácido nucleico, se prevé particularmente que los elementos reguladores se unan a promotores mínimos. De acuerdo con un elemento particular de la memoria descriptiva, el promotor usado es de 1000 nucleótidos o menos de longitud, 900 nucleótidos o menos, 800 nucleótidos o menos, 700 nucleótidos o menos, 600 nucleótidos o menos, 500 nucleótidos o menos, 400 nucleótidos o menos, 300 nucleótidos o menos o 250 nucleótidos o menos. Los ejemplos de promotores que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, el promotor de ApoA-I, el promotor de ApoA-II, el promotor de ApoA-IV, el promotor de ApoB, el promotor de ApoC-I, el promotor de ApoC-II, el promotor de ApoC-III, el promotor de ApoE, el promotor de albúmina, el promotor de α -fetoproteína, el promotor de fosfoenolpiruvato carboxikinasa 1 (PCK1), el promotor de

fosfoenolpiruvato carboxicinas 2 (PCK2), el promotor de transtiretina (TTR), el promotor de α -antitripsina (AAT o SERPINA1), el promotor de TK (timidina cinasa), el promotor de hemopexina, el promotor de alcohol deshidrogenasa 6, el promotor de colesterol 7 α -hidroxilasa, el promotor del factor IX, el promotor de α -microglobulina, el promotor de SV40, el promotor de CMV, el promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous y el promotor de VHB. Cualquiera de estos promotores también puede usarse como un promotor mínimo, que se han documentado bien en la técnica (véase, por ejemplo, Gehrke *et al.*, 2003; Vandendriessche *et al.*, 2007; documento WO01/098482). Un promotor mínimo particularmente previsto es el promotor mínimo de TTR, más particularmente como se define en la SEQ ID NO: 17. A veces se mencionan promotores mínimos como promotores basales o centrales. Aunque estos pueden diferir algo con respecto a las secuencias que están ausentes en el promotor, todos estos promotores que carecen de (parte de) sus secuencias reguladoras se prevén dentro de la definición de promotores mínimos.

Las secuencias reguladoras como se divulga en este documento pueden usarse en los casetes de expresión de ácido nucleico. De acuerdo con un elemento particular de la memoria descriptiva, únicamente un elemento regulador se incluye en el casete de expresión. De acuerdo con un elemento particular alternativo de la memoria descriptiva, se incluye más de un elemento regulador en el casete de expresión de ácido nucleico, es decir, se combinan de forma modular para potenciar su efecto regulador (y/o potenciador). De acuerdo con un elemento particular adicional de la memoria descriptiva, se usan dos o más copias del mismo elemento regulador en el casete de expresión de ácido nucleico. Por ejemplo, puede proporcionarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 copias de un elemento regulador como repeticiones en tándem. De acuerdo con otro elemento particular adicional de la memoria descriptiva, el más de un elemento regulador incluido en el casete de expresión de ácido nucleico comprende al menos dos elementos reguladores diferentes. Ambos elementos no son mutuamente excluyentes, es posible combinar ambos elementos reguladores idénticos y no idénticos entre sí en los casetes de expresión de ácido nucleico descritos en este documento. Como la combinación de elementos reguladores funcionará como un elemento regulador en el casete de expresión de ácido nucleico, este elemento de la memoria descriptiva es en gran medida equivalente a las combinaciones de secuencias en un elemento regulador. Sin embargo, como cada una de las secuencias funciona como elemento regulador tal cual, se prefiere hacer referencia a ellas como combinación de secuencias reguladoras, y a casetes de expresión de ácido nucleico que contienen más de una secuencia reguladora. Aunque en teoría no hay límite superior al número de elementos reguladores que pueden incluirse en el casete de expresión (aparte de la viabilidad de clonación), de acuerdo con un elemento de la memoria descriptiva se prevé particularmente que la longitud de los elementos reguladores totales en el casete de expresión de ácido nucleico no exceda de 1000 nucleótidos. De acuerdo con elementos particulares adicionales de la memoria descriptiva, la longitud total de los elementos reguladores no excede de 900 nucleótidos, 800 nucleótidos, 750 nucleótidos, 700 nucleótidos, 600 nucleótidos, 550 nucleótidos, 500 nucleótidos, 450 nucleótidos, 400 nucleótidos, 350 nucleótidos, 300 nucleótidos, 250 nucleótidos, 200 nucleótidos, 175 nucleótidos, 150 nucleótidos, 125 nucleótidos, 110 nucleótidos, 100 nucleótidos, 90 nucleótidos, 80 nucleótidos, 75 nucleótidos, 70 nucleótidos, 65 nucleótidos, 60 nucleótidos, 55 nucleótidos o 50 nucleótidos. Sin embargo, la longitud mínima definida para los elementos reguladores también se aplica a elementos reguladores o combinaciones de los mismos usados en casetes de expresión de ácido nucleico.

Como la carga del casete de expresión de ácido nucleico se ve influida tanto por el promotor como por el uno o más elementos reguladores, se prevé que de acuerdo con una realización particular la longitud total del promotor y los elementos reguladores en el casete de expresión de ácido nucleico sea de 1000 nucleótidos o menos, 900 nucleótidos o menos, 800 nucleótidos o menos, 750 nucleótidos o menos, 700 nucleótidos o menos, 600 nucleótidos o menos, 550 nucleótidos o menos, 500 nucleótidos o menos, 450 nucleótidos o menos, 400 nucleótidos o menos, 350 nucleótidos o menos, 300 nucleótidos o menos o incluso 250 nucleótidos o menos.

De acuerdo con un elemento muy específico de la memoria descriptiva, los elementos reguladores de ácido nucleico son los únicos elementos reguladores (y/o potenciadores) en el casete de expresión de ácido nucleico, no hay ya, por ejemplo, elementos reguladores presentes en el promotor, o ningún potenciador adicional en la construcción. De acuerdo con un elemento específico adicional de la memoria descriptiva, las secuencias seleccionadas del grupo de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias o un fragmento funcional de las mismas son las únicas secuencias reguladoras (y/o potenciadoras) presentes en el elemento regulador o el casete de expresión de ácido nucleico, es decir, el elemento regulador no contiene otras secuencias reguladoras o potenciadoras.

Como ya se indica, las secuencias reguladoras pueden ejercer su efecto sobre la expresión independientemente del promotor particular o las secuencias génicas o (trans)génicas. La naturaleza del gen o (trans)gen, por consiguiente, no es vital para la invención, siempre que el promotor unido de forma funcional y el elemento regulador sean satisfactorios en la transcripción de la secuencia. De acuerdo con realizaciones particulares, los casetes de expresión de ácido nucleico se usarán en genoterapia, y el transgén se expresará principalmente en el hígado. En algunos casos, el producto génico también puede secretarse al torrente sanguíneo después de la síntesis. Por tanto, se incluye dentro del alcance de esta solicitud cualquier transgén que codifique un ácido nucleico (por ejemplo, ARN) y/o un polipéptido que circulará en la sangre.

Típicamente, el transgén será una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido implicado en la respuesta inmunitaria, hematopoyesis, inflamación, crecimiento y proliferación celular, diferenciación de linaje celular y/o la respuesta de sobrecarga.

- 5 El transgén puede ser homólogo o heterólogo al promotor (y/o al animal, en particular mamífero, en que se introduce, en casos donde el casete de expresión de ácido nucleico se usa para genoterapia). Además, el transgén puede ser una secuencia de ADNc de longitud completa o ADN genómico, o cualquier fragmento, subunidad o mutante de la misma que tenga al menos alguna actividad biológica. En particular, el transgén puede ser un minigén, es decir, una secuencia génica que carece de parte, la mayoría o todas sus secuencias intrónicas. El transgén, por
- 10 tanto, puede contener opcionalmente secuencias intrónicas. Opcionalmente, el transgén puede ser una secuencia de ácido nucleico híbrida, es decir, una construida a partir de fragmentos homólogos y/o heterólogos de ADNc y/o ADN genómico. El transgén también puede ser opcionalmente un mutante de una o más secuencias de ADNc de origen natural y/o genómicas.
- 15 El transgén puede aislarse y obtenerse en cantidad adecuada usando uno o más métodos que son bien conocidos en la técnica. Estos métodos y otros útiles para aislar un transgén se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (*supra*) y en Berger y Kimmel (Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques, vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA (1987)).
- 20 El uso de secuencias mutantes transgénicas también se contempla en la solicitud. Un transgén mutante es un transgén que contiene una o más sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de tipo silvestre. La sustitución eliminación y/o inserción de nucleótidos puede dar lugar a un producto génico (es decir, proteína o ARN) que es diferente en su secuencia de aminoácidos/ácido nucleico de la secuencia de aminoácidos/ácido nucleico de tipo silvestre. La preparación de dichos mutantes es bien conocida en la técnica.
- 25 De acuerdo con una realización particular, el producto codificado por el transgén es una proteína. De acuerdo con un elemento particular adicional de la memoria descriptiva, el producto es una proteína terapéutica.
- 30 Una lista no exhaustiva y no limitante de transgenes (y proteínas terapéuticas) prevista en la solicitud incluye factor VIII, factor IX, factor VII, factor X, factor de von Willebrand, eritropoyetina (EPO), interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), ligando 5 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL5), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor
- 35 estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor de necrosis tumoral (TNF), afamina (AFM), α 1-antitripsina, α -galactosidasa A, α -L-iduronidasa, ATP7b, ornitina transcarbamoilasa, fenilalanina hidroxilasa, lipoproteína lipasa, apolipoproteínas, receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL-R), albúmina, glucosa-6-fosfatasa, transgenes que codifican anticuerpos, nanocuerpos, proteínas dominantes negativas antiviricas y fragmentos, subunidades o mutantes de los mismos.
- 40 De acuerdo con un elemento muy específico de la memoria descriptiva, el casete de expresión de ácido nucleico no contiene un transgén, pero el uno o más elementos reguladores unidos de forma funcional al promotor se usan para dirigir la expresión un gen endógeno (que, por tanto, es equivalente al transgén en términos de expresión potenciada y/o específica de tejido). El casete de expresión de ácido nucleico puede integrarse en el genoma de la célula o permanecer episómico.
- 45 Pueden incorporarse otras secuencias en el casete de expresión de ácido nucleico también, típicamente para aumentar adicionalmente o estabilizar la expresión del producto transgénico (por ejemplo, intrones y/o secuencias de poliadenilación). Puede utilizarse cualquier intrón en los casetes de expresión descritos en este documento. El término "intrón" abarca cualquier parte de un intrón completo que es suficientemente grande para que la reconozca y la someta a ajuste el aparato de ajuste nuclear. Típicamente, se prefieren secuencias intrónicas cortas y funcionales para mantener el tamaño del casete de expresión lo más pequeño posible, que facilita la construcción y manipulación del casete de expresión. En algunos elementos de la memoria descriptiva, el intrón se obtiene de un
- 55 gen que codifica la proteína que está codificada por la secuencia codificante dentro del casete de expresión. El intrón puede estar ubicado 5' a la secuencia codificante, 3' a la secuencia codificante o dentro de la secuencia codificante. Una ventaja de ubicar el intrón 5' a la secuencia codificante es minimizar la posibilidad de interferencia de intrones con la función de la señal de poliadenilación.
- 60 Cualquier señal de poliadenilación que dirija la síntesis de una cola de poli A es útil en los casetes de expresión descritos en este documento, cuyos ejemplos son bien conocidos para los expertos en la materia (por ejemplo, la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina).
- 65 Los casetes de expresión descritos en la solicitud pueden usarse, por ejemplo, para expresar proteínas que se expresan normalmente y se utilizan en el hígado, o para expresar proteínas que se expresan en el hígado y después se exportan al torrente sanguíneo para transportar a otras partes del organismo (tal como proteína de factor IX). Por

tanto, de acuerdo con algunos elementos particulares de la memoria descriptiva, los casetes de expresión de la invención pueden usarse para expresar una cantidad terapéutica de un polipéptido (u otro producto génico, tal como ARN) para mejorar los síntomas de una enfermedad. Típicamente, el producto génico está codificado por la secuencia codificante dentro del casete de expresión (es decir, el transgén), aunque en principio también es posible

5 aumentar la expresión de un gen endógeno. Una "cantidad terapéutica", como se usa en este documento, es una cantidad que mejora los síntomas de una enfermedad. Dicha cantidad típicamente dependerá del producto génico y la gravedad de la enfermedad, pero puede decidirse por el experto en la materia, posiblemente mediante experimentación rutinaria. En la sección de ejemplos se describe la manera en que se consiguen las cantidades terapéuticas de expresión de factor IX.

10 De acuerdo con un elemento particular de la memoria descriptiva, los casetes de expresión descritos en esta solicitud dirigen la expresión de una cantidad terapéutica del producto génico codificado por la secuencia codificante durante un periodo prolongado. De hecho, siempre que se consigan niveles terapéuticos, no es necesario un nuevo tratamiento. Típicamente, se prevé que la expresión terapéutica dure al menos 20 días, al menos 50 días, al menos

15 100 días, al menos 200 días y en algunos casos 300 días o más. La expresión del producto génico (por ejemplo, polipéptido) codificado por la secuencia codificante puede medirse por cualquier medio reconocido en la técnica, tal como por ensayos basados en anticuerpo, por ejemplo, un ensayo de transferencia de Western o ELISA, por ejemplo, para evaluar si se consigue la expresión terapéutica del producto génico. La expresión del producto génico también puede medirse en un bioensayo que detecta una actividad enzimática o biológica del producto génico.

20 En un aspecto adicional, la memoria descriptiva describe vectores que incluyen un elemento regulador como se describe en este documento. De acuerdo con una realización particular adicional, los vectores contienen un casete de expresión como se describe en este documento. Los vectores pueden ser vectores episómicos (es decir, que no se integran en el genoma de una célula hospedadora) o pueden ser vectores que se integran en el genoma de la

25 célula hospedadora. Los ejemplos de vectores episómicos incluyen plásmidos (extracromosómicos) y los llamados minicirculos, que están compuestos del casete de expresión únicamente y están desprovistos de secuencias bacterianas, y ejemplos de vectores que se integran en el genoma de la célula hospedadora incluyendo vectores víricos.

30 Los vectores plasmídicos representativos incluyen vectores pUC, vectores bluescrip (pBS) y pBR322 o derivados de los mismos que están desprovistos de secuencias bacterianas (minicirculos). Algunos de los vectores plasmídicos pueden adaptarse para incorporar elementos que potencien la persistencia del plásmido episómico en las células transfectadas. Dichas secuencias incluyen S/MAR que corresponden a módulos de región adherida a estructura/matriz unidos a una unidad de transcripción (Jenke *et al.*, 2004; Manzini *et al.*, 2006).

35 Los vectores víricos representativos incluyen vectores derivados de virus adenoasociados, adenovirus, retrovirus y lentivirus. Como alternativa, pueden usarse sistema de suministro génico para combinar componentes víricos y no víricos, tales como nanopartículas o virosomas (Yamada *et al.*, 2003).

40 Los retrovirus y lentivirus son virus de ARN que tienen la capacidad de insertar sus genes en cromosomas de la célula hospedadora después de la infección. Se han desarrollado vectores retrovíricos y lentivíricos que carecen de los genes que codifican proteínas víricas, pero retienen la capacidad de infectar células e insertar sus genes en los cromosomas de la célula diana (Miller, 1990; Naldini *et al.*, 1996). La diferencia entre un vector lentivírico y un vector retrovírico basado en el virus de la leucemia murina de Moloney (MLV) clásico es que los vectores lentivíricos

45 pueden transducir tanto células en división como células que no están en división, mientras que los vectores retrovíricos basados en MLV pueden transducir únicamente células en división.

Los vectores adenovíricos se diseñan para administrarlos directamente a un sujeto vivo. A diferencia de los vectores retrovíricos, la mayoría de los genomas de vector adenovírico no se integran en el cromosoma de la célula

50 hospedadora. En su lugar, los genes introducidos en células usando vectores adenovíricos se mantienen en el núcleo como un elemento extracromosómico (episoma) que persiste durante un periodo prolongado de tiempo. Los vectores adenovíricos transducen células en división y células que no están en división en muchos tejidos diferentes *in vivo* incluyendo células epiteliales de las vías respiratorias, células endoteliales, hepatocitos y diversos tumores (Trapnell, 1993).

55 El virus adenoasociado (AAV) es un virus de ADNmc pequeño que infecta seres humanos y algunas otras especies de primates, que no se sabe que causen enfermedad y por consiguiente causan únicamente una respuesta inmunitaria muy leve. El AAV puede infectar tanto células en división como células que no están en división y pueden incorporar su genoma en el de la célula hospedadora. Estas características hacen que AAV sea un

60 candidato muy atractivo para crear vectores víricos para genoterapia, aunque la capacidad de clonación del vector está relativamente limitada.

Otro vector vírico se obtiene del virus del herpes simple, un virus de ADN bicatenario grande. Formas recombinantes del virus de la varicelovacuina, otro virus de ADNbc, pueden acomodar insertos grandes y se generan por

65 recombinación homóloga.

De acuerdo con una realización particular, el vector es un vector vírico. De acuerdo con realizaciones particulares adicionales, el vector es un vector AAV. De acuerdo con realizaciones alternativas, el vector es un vector lentivírico.

En un aspecto particular adicional, los elementos reguladores de ácido nucleico, los casetes de expresión de ácido nucleico y los vectores descritos en este documento pueden usarse en genoterapia. Los protocolos de genoterapia, pretendidos para conseguir la expresión de producto génico terapéutico en células diana, *in vitro*, pero también particularmente *in vivo*, se han descrito ampliamente en la técnica. Estos incluyen, aunque sin limitación, inyección intramuscular de ADN plasmídico (desnudo o en liposomas), inyección intersticial, instilación en las vías respiratorias, aplicación al endotelio, parénquima intrahepático y administración intravenosa o intraarterial (por ejemplo, arteria intrahepática, vena intrahepática). Se han desarrollado diversos dispositivos para potenciar la disponibilidad de ADN para la célula diana. Una estrategia simple es poner en contacto la célula diana físicamente con catéteres o materiales implantables que contienen ADN. Otra estrategia es utilizar dispositivos de inyección sin aguja, de chorro que proyectan una columna de líquido directamente al tejido diana a alta presión. Estos paradigmas de suministro también pueden usarse para suministrar vectores víricos. Otra estrategia para el suministro génico dirigido es el uso de conjugados moleculares, que consisten en ligandos proteínicos o sintéticos a los que se ha adherido un agente de unión a ácido nucleico o ADN para dirigir específicamente ácidos nucleicos a células (Cristiano *et al.*, 1993).

De acuerdo con una realización particular, el uso de los elementos reguladores de ácido nucleico, los casetes de expresión de ácido nucleico o vectores como se describe en este documento están previstos para genoterapia de células hepáticas. De acuerdo con un elemento particular adicional de la memoria descriptiva el uso de los elementos reguladores, los casetes de expresión o vectores es para genoterapia *in vivo*. De acuerdo con otra realización particular adicional, el uso es para un método de genoterapia para tratar la hemofilia, en particular para tratar la hemofilia B.

La transferencia génica en hepatocitos de mamífero se ha realizado usando tanto procedimientos *ex vivo* como *in vivo*. La estrategia *ex vivo* requiere recoger células hepáticas, transducción *in vitro* con vectores de expresión a largo plazo y reintroducción de los hepatocitos transducidos en la circulación portal (Kay *et al.*, 1992; Chowdhury *et al.*, 1991). La dirección *in vivo* se ha hecho inyectando ADN o vectores víricos en el parénquima hepático, la arteria hepática o la vena porta, así como mediante dirección transcripcional (Kuriyama *et al.*, 1991; Kistner *et al.*, 1996). Los métodos recientes también incluyen suministro intraportal de ADN desnudo (Budker *et al.*, 1996) y transfección en la vena de la cola hidrodinámica (Liu *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999).

De acuerdo con un aspecto adicional, en este documento se divulgan métodos para expresar una proteína en células hepáticas, que comprenden las etapas de introducir en las células hepáticas un casete de expresión de ácido nucleico (o un vector) como se describe en este documento y expresar el producto proteínico transgénico en las células hepáticas. Estos métodos pueden realizarse tanto *in vitro* como *in vivo*.

También se describen métodos de genoterapia para un sujeto que lo necesita, que comprenden las etapas de introducir en el hígado del sujeto un casete de expresión de ácido nucleico que contiene un transgén que codifica una proteína terapéutica y expresar una cantidad terapéutica de la proteína terapéutica en el hígado.

De acuerdo con un elemento adicional de la memoria descriptiva, el método comprende las etapas de introducir en el hígado del sujeto un vector que comprende el casete de expresión de ácido nucleico que contiene un transgén que codifica una proteína terapéutica y expresar una cantidad terapéutica de la proteína terapéutica en el hígado.

De acuerdo con un elemento muy específico de la memoria descriptiva, la proteína terapéutica codificada por el transgén en el casete de expresión de ácido nucleico es el factor IX, y el método es un método para tratar la hemofilia B. Expresando el factor IX en el hígado mediante genoterapia, puede tratarse la hemofilia B (Snyder *et al.*, 1999).

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un casete de expresión de ácido nucleico que contiene un transgén que codifica una proteína terapéutica, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con otro elemento de la memoria descriptiva, la composición farmacéutica comprende un vector que contiene el casete de expresión de ácido nucleico que contiene un transgén que codifica una proteína terapéutica, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con elementos particular adicionales de la memoria descriptiva, el transgén codifica el factor IX y la composición farmacéutica es para tratar la hemofilia B.

También se prevé el uso de elementos reguladores como se divulga en este documento para la fabricación de estas composiciones farmacéuticas.

Debe entenderse que, aunque realizaciones particulares, elementos, construcciones específicas y configuraciones, así como materiales, se han analizado en este documento para dispositivos divulgados en la memoria descriptiva, pueden hacerse diversos cambios o modificaciones en su forma y detalle sin alejarse del alcance de esta invención.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor, realizaciones particulares, y no deben considerarse limitantes de la solicitud. La solicitud está limitada únicamente por las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Identificación de secuencias reguladoras específicas de hígado

Introducción

Se usó una estrategia informática para descubrir y caracterizar módulos potenciadores/reguladores específicos de tejido. No se necesita ningún conocimiento previo de los motivos que contienen. La estrategia consiste esencialmente en las siguientes etapas:

- (1) identificación de genes específicos de tejido que se expresen elevadamente basándose en análisis estadístico de datos de expresión de micromatriz de tejidos normales;
- (2) extracción de las secuencias promotoras correspondientes a partir de bases de datos genómicas disponibles al público;
- (3) identificación de los módulos reguladores y los motivos que contienen, usando una estrategia novedosa de matriz de diferencia de distancias (DDM) (De Bleser *et al.*, 2007). Con la estrategia de DDM, se detectaron elementos reguladores, tanto potenciadores como silenciadores. Estos elementos entonces se modelaron como conjuntos de los motivos que contienen.
- (4) A continuación, se investigó el contexto genómico de los genes específicos de tejido que se expresan elevadamente para grupos de motivos que son parte de estos conjuntos. Si estos grupos coinciden con regiones que están muy conservadas dentro de varias especies, estas regiones se consideraban módulos potenciadores putativos. Obsérvese que lo mismo puede hacerse para genes específicos de tejido que se expresan poco y módulos silenciadores putativos.

La validación de los módulos potenciadores candidatos se hizo ensayando si la inclusión en una construcción mínima aumenta la expresión de un gen indicador (véanse los ejemplos 2 y 3).

Estrategia de matriz de diferencia de distancias (DDM)

Como entrada para el método de DDM, se usó un conjunto de secuencias en dirección 5' de los sitios de inicio de la transcripción de 59 genes específicos de hígado (sobre)expresados elevadamente y un conjunto del mismo tamaño de secuencias en dirección 5' de los sitios de inicio de la transcripción de 59 genes específicos de hígado subexpresados. Se incluye una lista de los genes específicos de hígado en la tabla I, indicados por sus ID de secuencia de referencia (RefSeq versión 28, marzo de 2008, para la revisión de secuencias, véase <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>). El objetivo del método de DDM fue identificar los sitios de unión a factor de transcripción que están fuertemente asociados con sobre- o subexpresión.

RefSeq ID de genes específicos de hígado					
Sobreexpresados			Subexpresados		
NM_000483	NM_181755	NM_004032	NM_001679	NM_006449	NM_000112
NM_000669	NM_005525	NM_022437	NM_006636	NM_001748	NM_014629
NM_000667	NM_000045	NM_001133	NM_001673	NM_001006613	NM_018639
NM_000668	NM_194431	NM_012205	NM_006347	NM_172056	NM_004460
NM_000773	NM_194430	NM_000463	NM_001444	NM_178234	NM_032970
NM_001443	NM_000029	NM_000767	NM_001628	NM_032926	NM_018433
NM_001063	NM_000762	NM_001014975	NM_139207	NM_003902	NM_014313
NM_000670	NM_206933	NM_031371	NM_016156	NM_017412	NM_006803
NM_145727	NM_033294	NM_000672	NM_002086	NM_052905	NM_014782
NM_000384	NM_033304	NM_000163	NM_001527	NM_015678	NM_013262
NM_000506	NM_000680	NM_022436	NM_002475	NM_014746	NM_015484
NM_000042	NM_032958	NM_004490	NM_003161	NM_005779	NM_004227
NM_080914	NM_000063	NM_005886	NM_133640	NM_004349	NM_015087
NM_001181	NM_001995	NM_005410	NM_020117	NM_001164	NM_018444
NM_003057	NM_032951	NM_004139	NM_138962	NM_000415	NM_002718
NM_000185	NM_000583	NM_000896	NM_007085	NM_003601	NM_004426
NM_003725	NM_000508	NM_000784	NM_002902	NM_198902	NM_002210
NM_000715	NM_020980	NM_001701	NM_000933	NM_152422	NM_052822

RefSeq ID de genes específicos de hígado					
Sobreexpresados			Subexpresados		
NM_001710	NM_001461	NM_014012	NM_001483	NM_033198	NM_001448
NM_000429	NM_007220		NM_006353	NM_181777	

Tabla I. ID de secuencia de referencia de genes específicos de hígado sobre- y subexpresados cuyas secuencias reguladoras se seleccionaron como entrada para el método de DDM.

La estrategia de matriz de diferencia de distancias se ha descrito en detalle en otra parte (De Bleser *et al.*, 2007). En resumen, puede esperarse que la sensibilidad de los dos conjuntos de promotores de genes específicos de hígado regulados de forma diferencial a un estímulo dado pueda explicarse por los sitios de unión a factor de transcripción (TFBS) compartidos por ambos conjuntos de promotores, aunque esto no puede explicar la dirección de la respuesta. Al lado de este conjunto común de TFBS, cada conjunto de promotores puede albergar uno o más TFBS que son más característicos de los promotores del grupo regulado por aumento o del grupo regulado por disminución de genes, y podría explicar, al menos parcialmente, el comportamiento diferencial observado. Estos TFBS "diferenciales" pueden encontrarse usando el siguiente procedimiento. En primer lugar, cada promotor de cada conjunto se usa como entrada para el programa Match™ (Kel *et al.*, 2003) o cualquier otro programa similar, que predirá los TFBS en el mismo usando una colección prerrecopilada de matrices ponderales posicionales (PWM). Los resultados, que son el número de TFBS predichos por PWM por promotor (mencionado además como recuentos) se recogen en forma de una matriz en que cada fila corresponde a una secuencia de promotor mientras que las columnas corresponden a la PWM usada. Las columnas se mencionan además como PWM-vectores, que caracterizan una PWM por su número de TFBS predichos por promotor. La elección para usar el número total de TFBS predichos por PWM por promotor está motivada por la observación de Papatsenko *et al.* (Papatsenko *et al.*, 2002) de que regiones reguladoras de *Drosophila melanogaster* contienen múltiples copias de motivos robustos, así como copias más débiles. En general, es razonable asumir que la presencia de múltiples sitios de unión para un factor de transcripción desempeña una función importante. Además, se demostró en levadura que genes cuyos promotores comparten pares de TFBS tienen significativamente mayor probabilidad de coexpresarse que genes cuyos promotores tienen únicamente TFBS individuales en común (Pilpel *et al.*, 2001). En línea con esta observación, la simple combinación de TFBS específicos de hígado individuales para producir elementos potenciadores compuestos produjo resultados decepcionantes (Lemken *et al.*, 2005). Como el método de DDM considera tanto la sobrerrepresentación como la asociación, considerar múltiples coincidencias por promotor puede ayudar a descubrir TFBS funcionales putativos por sobrerrepresentación. Dos TFBS se consideran correlacionados si sus columnas correspondientes en la matriz son similares. La similitud entre las columnas puede medirse usando una función de distancias. Con esta estrategia, se construyen matrices de distancias que suman todas las asociaciones de TFBS para los TFBS en ambos conjuntos de promotores. Finalmente, calculando la DDM y realizando cambio de escala multidimensional (MDS) sobre esta matriz para visualizar su contenido en dos dimensiones se pueden distinguir los TFBS que no contribuyen a la expresión génica diferencial observada, ya que se cartografiarán cerca del origen del diagrama de DDM-MDS, a partir de los TFBS de "desviación" que probablemente son responsables de la expresión génica diferencial observada. Como el procedimiento de MDS representará los TFBS que están fuertemente asociados más cercanos que los menos asociados, resalta la mayoría de las interacciones por lo demás a menudo difusas entre los TFBS en los conjuntos de datos de promotores. Como alternativa, los resultados pueden resumirse en una tabla.

El fundamento detrás de este procedimiento se basa en la asociación y sobrerrepresentación individual (de una condición en comparación con la otra). De hecho, aunque se sabe que muchos factores de transcripción están regulados por aumento específicamente en el hígado, esto no implica automáticamente que estos estén implicados en la regulación por aumento de la expresión génica *in vivo*. Módulos importantes en una condición, pero no en la otra, se caracterizarán por la sobrerrepresentación de sus TFBS consistentes y se asociarán. Esto provoca bajos valores de DD para dos TFBS asociados, mientras que el valor de DD para un TFBS que está sobrerrepresentado y TFBS comunes será elevado. Que los TFBS (y el módulo) sean típicos para el primero o el segundo conjunto de promotores puede obtenerse del signo de la suma de los valores de la columna de la DDM original.

Los factores asociados con la máxima expresión génica específica de hígado (usando condiciones muy rigurosas) se resumen en la tabla II:

Identificador	Valor-P	Valor-Q	Nombre de factor
V.LEF1_Q2	0,001	0,02	LEF-1
V.CEBP_Q2_01	0,008	0,03	C/EBPalfa
V.HNF1_Q6_01	0,005	0,03	HNF-1alfa
V.FOXO1_Q2	0,001	0,02	FOXO1
V.FOXO4_Q2	0,004	0,03	FOXO4
V.IRF1_Q6	0,005	0,03	IRF-1

Identificador	Valor-P	Valor-Q	Nombre de factor
V.E47_01	0,007	0,03	E47
V.E12_Q6	0,005	0,03	E12

Tabla II. Sitios de unión a factor de transcripción asociados con la máxima expresión génica específica de hígado.

El valor-P mostrado en la tabla II se determinó usando el protocolo de DDM-MDS, calculando la distancia entre el origen del diagrama de MDS y el TFBS cartografiado. Esta distancia cuantifica el grado al que este TFBS está sobrerrepresentado en el conjunto de datos del promotor. A continuación, se estima un valor *P* para esta distancia. El procedimiento DDM-MDS se aplicó a 10 000 conjuntos aleatorios y se obtuvieron las distancias resultantes de cada TFBS cartografiado al origen del diagrama DDM-MDS. Posteriormente, se calculó el valor *P* de una distancia real a partir de la fracción de las "distancias de fondo" correspondientes que exceden esta distancia real.

El valor-Q de un ensayo de hipótesis individual es la "tasa de descubrimientos falsos" (FDR) mínima a la que el ensayo puede denominarse significativo. La FDR controla la proporción esperada de hipótesis nulas rechazadas incorrectamente (errores de tipo I). Por ejemplo, un valor-q de 0,02 (2 %) significa que hay una probabilidad de 1 a 50 de que este resultado sea un positivo falso.

El contexto genómico de los 59 genes regulados por aumento se buscó a continuación para regiones conservadas (entre especies) enriquecidas para TFBS para los factores enumerados en la tabla II. Se tuvieron en cuenta tanto secuencias en dirección 5' como 3'. Como la búsqueda fue para sitios de unión conservados entre múltiples especies, y para combinaciones de motivos en lugar de un único sitio de unión; la probabilidad de que la secuencia identificada estuviera realmente implicada en la regulación de la expresión génica aumenta. De hecho, está bien establecido que la simple presencia o ausencia de sitios de unión a factor de transcripción en un promotor dado no es suficiente para conferir expresión específica de tejido de alto nivel. Es la combinación de TFBS como "reguladores" dentro de un contexto cromosómico particular lo que es clave en dictaminar la expresión específica de tejido de alto nivel. Cabe observar que con la excepción de los sitios de unión E12 y E47, de acuerdo con DDM, los otros TFBS tienden a formar módulos compuestos de diferentes miembros (es decir, están más "asociados" (caen más cercanos) en un diagrama de DDM-MDS).

Esta estrategia dio lugar a la identificación de 14 secuencias reguladoras enriquecidas en los sitios de unión de factor de transcripción anteriores, resumidos en la tabla III. Estas 14 secuencias se eligieron entonces para validación de sus propiedades reguladoras (potenciadoras) *in vivo*, véanse los ejemplos 2 y 3.

Secuencia	Gen regulado por sec.	Abr. de sec.	Ubicación genómica de secuencia	Longitud de sec. (pb)	TFBS conservado presente
SEQ ID NO: 1	SERPINA1	S1	cr14: 93891375-93891462	88	HNF1, CEBP, LEF-1/TCF
SEQ ID NO: 2	SERPINA1	S2	cr14: 93897160-93897200	41	HNF1, MyoD, Tal1β/E47
SEQ ID NO: 3	SERPINA1	Serp	cr14: 93924743-93924814	72	HNF1, FOX, CEBP, MyoD, LEF-1, LEF-1/TCF
SEQ ID NO: 4	ApoC4	A1	cr19: 50131065-50131135	71	FOX, CEBP, HNF-1
SEQ ID NO: 5	ApoH	A2	cr17: 61560686-61560858	173	IRF, HNF1, FOX, CEBP
SEQ ID NO: 6	ApoH	A3	cr17: 61597650-61598200	551	CEBP, HNF1, LEF-1, LEF-1/TCF, FOX, Tal1β/E47, IRF
SEQ ID NO: 7	ApoC1	Apo	cr19: 50119497-50119590	94	FOX, CEBP, LEF-1, LEF-1/TCF, MyoD, HNF1
SEQ ID NO: 8	ALB	AL	cr4: 74634950-74635050	101	HNF1, CEBP, LEF-1, IRF, FOX
SEQ ID NO: 9	AldoB	Aldo	cr9: 101277628-101277762	135	CEBP, HNF1, IRF, FOX, LEF-1, LEF-1/TCF, MyoD
SEQ ID NO: 10	CYP2E1	C	cr10: 135229600-135229740	141	CEBP, HNF1, LEF-1, LEF-1/TCF, MyoD, IRF, FOX
SEQ ID NO: 11	FGA	F	cr4: 155869502-155869575	74	CEBP, HNF1, LEF-1, LEF-1/TCF, MyoD
SEQ ID NO: 12	HPR	H	cr16: 71063010-71063450	441	CEBP, HNF1, LEF-1, LEF-1/TCF, FOX, Tal1β/E47, IRF, MyoD
SEQ ID NO: 13	TF	T1	cr3: 134944250-134944420	171	CEBP, HNF1, LEF-1, LEF-1/TCF, FOX, Tal1β/E47, IRF, MyoD
SEQ ID NO: 14	TTR	T2	cr18: 27425669-27425838	170	HNF1, CEBP, FOX, LEF-1, LEF-1/TCF, MyoD

Tabla III. Secuencias identificadas enriquecidas en los sitios de unión a factor de transcripción conservados enumerados en la tabla II. Abr.: abreviatura, sec.: secuencia.

Ejemplo 2. Validación *in vivo* de secuencias potenciadoras reguladoras específicas de hígadoMateriales y métodos*Construcción de pAAV-TTRmin-FIXIA*

En primer lugar, se extrajo ADN genómico de hígado de ratón normal usando el kit tisular DNAeasy, Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El promotor TTRmínimo (TTRmin) y parte de la 5' UTR se amplificaron posteriormente a partir de este ADN genómico de hígado de ratón usando los siguientes cebadores que se diseñaron basándose en la secuencia de Pubmed (BC024702/M19524) de la secuencia 5' del gen de ratón de transtiretina.

Cebador directo: AAGCGGCCGCGGTACCGTCTGTCTGCACATTCGTAGAGCGAGTGTTTC (SEQ ID NO: 15) (que contiene sitios de restricción de NotI y Acc65I)

Cebador inverso: AGCGCTAGCCAGGAGCTTGTGGATCTGTGTGACGGC (SEQ ID NO: 16) (que contiene sitio NheI)

El promotor TTRmin, desprovisto de las secuencias potenciadoras en dirección 5', se ha descrito por Costa *et al.* (1986 y 1989). La posición de inicio de TTRmin cae en la posición -202 (con respecto al sitio Cap), la secuencia finaliza en la región no traducida 5' antes del sitio de inicio de la traducción en el exón 1 de TTR (véase la SEQ ID NO: 17, véanse las secuencias de NCBI BC024702 y M19524).

Para PCR, se añadieron los siguientes componentes a un tubo de microcentrífuga sometido a autoclave en hielo: mezcla de reacción AccuPrime Pfx 10X (5,0 µl), mezcla de cebadores (10 µM cada uno, 1,5 µl), ADN molde (100 ng), ADN polimerasa AccuPrime Pfx (2,5 unidades) y se sometió a autoclave, se cubrió con agua destilada hasta 50 µl. El molde se desnatura durante 2 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de PCR (desnaturalización: 95 °C durante 15 s, hibridación: 58 °C durante 30 s, prolongación a 68 °C durante 1 min seguido de una prolongación final de 68 °C durante 5 min por kb. La secuencia TTRmin resultante se incluye como la SEQ ID NO: 17.

Para obtener el plásmido pAAV-TTRmin-FIXIA, el producto de PCR se restringió con NotI y NheI y se clonó en los sitios Not I-Nhe I correspondientes en dirección 5' del minigén del factor IX de pAAV-FIXIA. El minigén de FIX (denominado FIXIA) está compuesto del primer exón del ADNc de FIX humano seguido de un intrón A truncado y el resto del ADNc de FIX junto con una 3'UTR de 70 pb como se describe previamente (Miao *et al.*, 2001). Se usó poli A de la hormona del crecimiento (GH) bovina como señal de terminación de la transcripción.

pAAV-FIXIA es una construcción sin promotor derivada de pAAV-ApoHCR-AAT-FIXIA. Este plásmido pAAV-ApoHCR-AAT-FIXIA se describió previamente (VandenDriessche *et al.*, 2007) y se parece al vector AAV-ApoHCR-AAT-FIX que se usó previamente en un ensayo de genoterapia dirigido a hígado basado en AAV para hemofilia B (Manno *et al.*, 2006).

Construcción de pAAV-ApoHCR-AA T-FIXIA

Para generar el plásmido de pAAV usado con fines de control, el plásmido pAAV-MCS (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) se restringió con NotI y el plásmido pBS-HCRHP-FIXIA con SpeI. Después de rellenar los extremos cohesivos con el fragmento Klenow los dos fragmentos se ligaron por ligamiento de extremos romos. pBS-HCRHP-FIXIA lo proporcionó amablemente el Dr. C. Miao, Universidad de Washington (Miao *et al.*, 2001). Como un fragmento del promotor de AAT más corto dirige la expresión al hígado con una mayor especificidad que la presentada para fragmentos del promotor de AAT más grandes (Yull *et al.*, 1995), se usó el fragmento del promotor de AAT corto de 347 pb para la clonar nuestra construcción.

Síntesis de potenciador e incorporación de potenciadores en pAAV-TTRmin-FIXIA

Los potenciadores (véase la tabla III) se flanquearon con Acc65I y se clonaron en dirección 5' del TTRmin después de restricción de pAAV-TTRmin-FIXIA con Acc65I. Se construyeron sitios Ascl y MluI (isoesquizómeros) en el fragmento que contenía el potenciador justo después o antes del sitio Acc65I para permitir la clonación de múltiples potenciadores en dirección 5' del TTRmin. Los elementos reguladores flanqueados por estos sitios de restricción se proporcionan como las SEQ ID 18-31. Esto se consiguió después de restricción con MluI del vector y ligamiento al fragmento que contenía potenciador restringido por MluI/Ascl. Se muestra un esquema de las construcciones resultantes en la figura 1. Adicionalmente, para algunos de los potenciadores (Serp (SEQ ID NO: 3), A1 (SEQ ID NO: 4), S2 (SEQ ID NO: 2)), se insertaron múltiples repeticiones de potenciador en dirección 5' del promotor TTRmin (como se muestra en la figura 2). Todas las construcciones resultantes se verificaron por secuenciación de ADN.

Suministro génico hidrodinámico

Está bien establecido que el nivel de expresión *in vitro* de una construcción de expresión en líneas celulares hepáticas no es predictivo de su rendimiento *in vivo*. En su lugar, para abordar directamente el nivel de expresión de

un transgén dado en el hígado, es más apropiado comparar diferentes casetes de expresión por suministro génico hepático hidrodinámico *in vivo* (Miao *et al.*, 2000). Se usaron cepas C57/Bl6 adultas. Los experimentos en animales se aprobaron por la Comisión Ética sobre animales del K.U. Leuven. Los animales se alojaron en condiciones de bioseguridad de nivel II. A los ratones se les inyectó por suministro génico hidrodinámico, como se describe (Liu *et al.*, 1999). En resumen, los ratones se colocaron en un soporte de sujeción y después de calentar la cola bajo una lámpara de infrarrojos, se inyectaron diferentes dosis (0,5-1-2 µg) de los plásmidos respectivos en un volumen de 2 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (equivalente a un diez por ciento del peso corporal del ratón) en la vena de la cola en un tramo de tiempo corto de 5-7 segundos. Este método ha demostrado ser ineficaz en transfección *in vivo* de células hepáticas. Se extrajo el ADN plasmídico sin endotoxinas usando el kit Qiagen EndoFree (Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recogió sangre por exanguinación retroorbital con anestesia general. La presencia de FIX humano en muestras de plasma con un 20 % de citrato de sodio 0,1 M (para evitar la coagulación) se determinó usando un ensayo de inmunoabsorción enzimática (Asserachrome FIX ELISA, Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, EE. UU.). cada cohorte incluía 5 ratones por dosis por vector.

Resultados

Para evaluar el efecto de los elementos potenciadores reguladores específicos de hepatocitos identificados *in silico* sobre la expresión *in vivo*, se transfectaron construcciones de expresión que expresan hFIX en hepatocitos por suministro génico hidrodinámico (2 µg de ADN). En estas construcciones, la expresión de hFIX estaba dirigida por el promotor TTRmin o por el promotor TTRmin junto con uno o más potenciadores específicos de hepatocitos evolutivamente conservados que están muy enriquecidos en TFBS, identificados por el algoritmo de DDM y el método de cambio de escala multidimensional. Los resultados mostrados en la figura 3 indican que la mayoría de los potenciadores ensayados (AL, A1, A2, Aldo, Apo, F, S1, Serp, S2, T1 y T2) provocaban un aumento significativo (>40 %) en los niveles de expresión de hFIX en el plasma de ratones destinatarios, en comparación con los niveles obtenidos cuando se usaba el promotor TTRmin para dirigir la expresión de hFIX (figura 3). Por tanto, casi un 80 % de los potenciadores ensayados (11/14) provocaba niveles de expresión de hFIX significativamente mejorados, lo que valida además el algoritmo de predicción de DDM. Notablemente, especialmente las secuencias más cortas identificadas son eficaces en aumentar la expresión: las dos secuencias más largas de 400 nucleótidos ensayados (A3, H) no producían niveles de FIX significativamente aumentados en este experimento. Esto no excluye, sin embargo, una función fisiológica para estas secuencias. Los niveles de FIX máximos se consiguieron después de transfección hepática *in vivo* con la construcción pAAV-TTRmSerp-FIXIA. Esos niveles estaban aumentados 7 veces en comparación con cuando se usaba el promotor TTRmin. Cabe destacar que la expresión del factor IX estaba limitada al hígado para todas las construcciones, no se observó "filtración" de la expresión (por ejemplo, en el bazo).

Ejemplo 3. Validación *in vivo* de módulos de varias secuencias potenciadoras reguladoras específicas de hígado

Para validar adicionalmente la potencia de estos elementos potenciadores/reguladores, se incorporaron múltiples repeticiones de potenciador en dirección 5' del promotor TTRmin (por ejemplo, A1: repetido 2x, S2: repetido 6x o Ser: repetido 3x, véase la figura 2). Los resultados muestran que la incorporación de múltiples potenciadores provocaba un aumento adicional en los niveles de hFIX en circulación (figura 3 y 4). De hecho, los máximos niveles de FIX se consiguieron después de transfección hepática *in vivo* con la construcción pAAV-TTRmSerp3-FIXIA que contenía una repetición triple del potenciador Serp3 (figura 4). Esto se confirmó a todas las dosis ensayadas (0,5-1-2 µg de ADN). Los niveles de FIX obtenidos con esa construcción son aproximadamente 20 a 25 veces mayores que los niveles obtenidos con la construcción pAAV-TTRmin-FIX y significativamente mayores a los obtenidos con uno de los casetes de expresión específicos de hepatocitos más robustos conocidos (es decir, pAAV-Apo-HCR-AAT-FIX) (figura 4). Usando únicamente 2 µg de ADN, pudieron obtenerse niveles de FIX casi fisiológicos (niveles de FIX normales: 5000 ng/ml = 100 %). Cabe destacar que las concentraciones de FIX obtenidas con el plásmido pAAV-Apo-HCR-AAT-FIX están en buena concordancia con concentraciones presentadas previamente entre un 10 y un 40 % de niveles de FIX fisiológicos con esta construcción (Miao *et al.*, 2000), lo que demuestra la fiabilidad de los datos. Colectivamente, estos resultados demuestran que la generación *de novo* de promotores/potenciadores específicos de hepatocitos provocaba niveles de expresión de FIX robustos y por tanto confirma la superioridad de las construcciones modificadas con potenciador.

Ejemplo 4 - Combinaciones adicionales de elementos reguladores

Los potenciadores se validan adicionalmente generando diferentes combinaciones de los potenciadores en lugar de usando varias copias del mismo potenciador. Tanto combinaciones que usan potenciadores con sitios de unión a factor de transcripción similares como combinaciones usando potenciadores con TFBS complementarios se ensayan en combinación con el promotor TTR mínimo.

Se generan combinaciones adicionales con partes de los elementos reguladores identificados, por ejemplo, usando únicamente determinadas regiones de las SEQ ID NO: 1-14, en particular aquellas regiones con sitios de unión a factor de transcripción, aunque no necesariamente limitadas a ellas. Al hacerlo, pueden obtenerse nuevas secuencias reguladoras/potenciadoras, incluso más potentes.

Ejemplo 5. Validación *in vivo* de secuencias potenciadoras reguladoras específicas de hígado mediante suministro génico de vector AAV

5 Materiales y métodos

Líneas celulares y condiciones de cultivo

10 Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con L-glutamina (Gln) 2 mM, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS, Invitrogen, Merelbeke, Bélgica).

Producción de vector AAV: AAV9-TTRminSerp-FIXIA.

15 Se generaron vectores basados en AAV que expresan factor IX a partir de las mismas construcciones de expresión específicas de hepatocitos como en el ejemplo 2 (pAAV-TTRmin-FIXIA). En particular, la construcción con incorporación del potenciador Serp (SEQ ID NO: 3, véase la tabla III) se usó para empaquetamiento en vectores víricos AAV. Como un ejemplo, se eligió vector vírico de serotipo 9 de AAV para empaquetar la construcción, que se sabe que es un vector prometedor para genoterapia (Vandendriessche *et al.* 2007), produciendo AAV9-TTRminSerp-FIXIA. Los vectores AAV que expresan FIX humano se produjeron a un alto título por transfección con fosfato de calcio de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de transfección con fosfato de calcio, Invitrogen) de células 20 293 con ADN de vector de AAV2 (26 µg/placa de 10 cm), un plásmido auxiliar adenovírico (52 µg/placa de 10 cm) y plásmidos auxiliares de AAV que expresan Rep₂ y Cap₉ (26 µg/placa de 10 cm) para la producción de serotipos AAV9, como se describe en Gao *et al.* (2002), Mingozzi *et al.* (2003) y Gehrke (2003).

25 Dos días después de la transfección, las células se lisaron por ciclos sucesivos de congelación-descongelación y sonicación. Los lisados se trataron con benzonasa (Merck) y desoxicolato (Sigma-Aldrich) y posteriormente se sometieron a tres rondas sucesivas de ultracentrifugación en densidad de cloruro de cesio. Las fracciones que contenían las partículas AAV se concentraron usando un filtro Amicon (Millipore) y se lavaron con PBS con MgCl₂ 1 mM. Los títulos de genoma de vector se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) usando sondas TaqMan® y cebadores específicos para la secuencia de ADNc del factor FIX humano (hFIX) (directo [exon5] 5'AGGGATATCGACTTGCAGAAAA (SEQ ID NO: 32), sonda [exon5-exon6]: 5'AGTCCTGTGAACCAAGCAGTGCCATTTT (SEQ ID NO: 33), inverso - exon6: 35 5'GTGAGCTTAGAAGTTTGTGAAACAG (SEQ ID NO: 34)) o la señal de poliadenilación (directo: 5'GCCTTCTAGTTGCCAGCCAT (SEQ ID NO: 35), sonda: 5'TGTTTGCCCCCTCCCCCGTGC (SEQ ID NO: 36), inverso: 5'GGCACCTTCCAGGGTCAAG (SEQ ID NO: 37)).

Estudios en animales

40 Los procedimientos en animales se aprobaron por la Comisión Ética sobre animales de K.U. Leuven. Los animales se alojaron en condiciones de bioseguridad de nivel II. A los ratones se les inyectó el vector AAV9-TTRmin-FIXIA o AAV9-TTRminSerp-FIXIA como se describe en Vandendriessche *et al.* (2007). En resumen, se inyectaron (i.v.) 3x10⁹ o 3x10¹² genomas de vector (vg) de AAV en la vena de la cola de ratones C57Bl6 adultos (2-5 ratones/grupo). 45 Se recogió sangre por exanguinaciones retroorbitales con anestesia general. La expresión de FIX humano se determinó en plasma de ratón tratado con citrato usando un ELISA específico de FIX humano (Asserachrome/Diagnostica Stago, Parsippany, NJ, EE. UU.).

Los niveles de ARNm de FIX humano se analizaron en el ARN total, aislado de diferentes órganos por un kit de purificación basado en membrana con sílice (Invitrogen). En resumen, 2 µg de ARN total de cada muestra se sometieron a transcripción inversa usando un kit de síntesis de ADNc (Invitrogen); posteriormente, una cantidad de ADNc correspondiente a 20 ng de ARN total se amplificó por (Q)PCR usando los cebadores de FIX descritos anteriormente. Los niveles de ARNm de hFIX se normalizaron a los niveles de ARNm del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) murina usando sondas TaqMan® y cebadores (directo: 55 TGTGTCCGTCGTGGATCTGA (SEQ ID NO: 38), sonda CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACA (SEQ ID NO: 39), inverso CCTGCTTACCACTTCTTGA (SEQ ID NO: 40)). Las muestras de ARN se amplificaron con y sin RT para excluir la amplificación de ADN genómico. El tamaño del fragmento de PCR amplificado se verificó en un gel de agarosa 1,5 %.

60 Resultados

En los ejemplos previos, el ADN se suministró al hígado por suministro génico de ADN desnudo a alta presión (transfección hidrodinámica), sin depender de vectores víricos. Aquí, las construcciones pAAV-TTRmin-FIXIA y pAAV-TTRminSerp-FIXIA se empaquetaron en vectores víricos de AAV. Estos vectores pueden transferir directamente genes al hígado sin tener que recurrir a transfecciones hidrodinámicas a alta presión. El suministro génico con AAV en el hígado es una estrategia clínicamente relevante, está desprovisto de genes víricos y tiene el

potencial de expresión génica a largo plazo. Como un ejemplo, se usó serotipo 9 de AAV (Vandendriessche *et al.* 2007).

El rendimiento superior del potenciador Serp (SEQ ID NO: 3, véase la tabla III) se confirmó después de transducción hepática con vectores de AAV9. En particular, los vectores AAV9-TTRmin-FIXIA y AAV9-TTRminSerp-FIXIA se inyectaron por vía intravenosa mediante inyección en la vena de la cola en ratones C57Bl/6 adultos a una dosis de 5×10^9 copias de genoma (gc)/ratón. Los resultados mostrados en la figura 5 indican que la incorporación del potenciador Serp dio lugar a un aumento robusto en los niveles de expresión de FIX. El aumento en los niveles de proteína FIX después de la inclusión del potenciador Serp en el vector de AAV9 también fue coherente con un aumento de 10 veces en los niveles relativos de ARNm de FIX cuando se comparaba AAV9-TTRmin-FIXIA con AAV9-TTRminSerp-FIXIA. Notablemente, el vector AAV9-TTRminSerp-FIXIA alcanzó niveles de FIX terapéuticos mantenidos a una dosis relativamente baja (>30 % de los niveles de FIX normales a 5×10^9 gc/ratón después de 200 días), lo que subraya su potencia.

Además, se demostró por RT-qPCR sobre el ARN total de diferentes órganos de ratones a los que se ha inyectado AAV9-TTRminSerp-FIXIA, que la expresión de ARNm de hFIX está exclusivamente restringida al hígado mientras que el gen de FIX no se expresaba en ningún otro tejido (figura 6). Esto se confirmó incluso cuando se inyectaban dosis de vector extremadamente altas de 3×10^{12} copias genómicas (gc) por ratón (lo que asegura el suministro génico en otros tejidos), produciendo niveles de FIX excepcionalmente altos (>10 000 %, es decir, más de 500 000 ng/ml de los niveles de hFIX normales, que se definen como un 100 % o 5000 ng/ml). Además, el ARNm de FIX se expresa únicamente en el hígado, lo que confirma la especificidad de tejido de la expresión.

Referencias

- Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, Nueva York (1999).
- Barajas M, Mazzolini G, Genové G, Bilbao R, Narvaiza I, Schmitz V, Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology*. Enero de 2001; 33(1):52-61.
- Berger SL, Kimmel AR. Guide to Molecular Cloning Techniques. *Methods in Enzymology*, vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987.
- Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi L, Naldini L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med*. Mayo de 2006; 12(5):585-91.
- Brown BD, Cantore A, Annoni A, Sergi LS, Lombardo A, Della Valle P, D'Angelo A, Naldini L. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood*. 15 de diciembre de 2007; 110(13):4144-52.
- Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA. Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther*. Julio de 1996; 3(7):593-8.
- Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR Jr, Wilson JM. Long-term improvement of hypercholesterolemia after *ex vivo* gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science*. 20 de diciembre de 1991; 254(5039):1802-5.
- Costa RH, Lai E, Darnell JE Jr. Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific. *Mol Cell Biol*. Diciembre de 1986; 6(12):4697-708.
- Costa RH, Grayson DR, Darnell JE Jr. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol*. Abril de 1989; 9(4):1415-25.
- Cristiano RJ, Smith LC, Kay MA, Brinkley BR, Woo SL. Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilizing a conjugated adenovirus-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15 de diciembre de 1993; 90(24):11548-52.
- De Bleser P, Hooghe B, Vlieghe D, van Roy F. A distance difference matrix approach to identifying transcription factors that regulate differential gene expression. *Genome Biol*. 2007; 8(5):R83.
- Ferry N, Heard JM. Liver-directed gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*. 20 de septiembre de 1998; 9(14):1975-81.
- Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, Boccaccio C, Naldini L. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes *in vivo* by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*. 20 de enero de 2002; 13(2):243-60.
- Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99:11854-9.

- Mingozzi F, Liu YL, Dobrzynski E, Kaufhold A, Liu JH, Wang Y, Arruda VR, High KA, Herzog RW. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by *in vivo* hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 2003; 111:1347-56.
- 5 Gehrke S, Jérôme V, Müller R. Chimeric transcriptional control units for improved liver-specific transgene expression. *Gene*. 11 de diciembre de 2003; 322:137-43.
- Ghosh SS, Takahashi M, Thummala NR, Parashar B, Chowdhury NR, Chowdhury JR. Liver-directed gene therapy: promises, problems and prospects at the turn of the century. *J Hepatol*. 2000; 32 (Supl. 1):238-52.
- 10 Jenke AC, Stehle IM, Herrmann F, Eisenberger T, Baiker A, Bode J, Fackelmayer FO, Lipps HJ. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 3 de agosto de 2004; 101(31):11322-7.
- 15 Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder KP, Liu T, Finegold M, Darlington G, Pokorny W, Woo SLC. Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 de enero de 1992; 89(1):89-93.
- 20 Kel AE, Gössling E, Reuter I, Cheremushkin E, Kel-Margoulis OV, Wingender E. MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 1 de julio de 2003; 31(13):3576-9.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lübbert H, Bujard H. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 de octubre de 1996; 93(20):10933-8.
- 25 Kramer MG, Barajas M, Razquin N, Berraondo P, Rodrigo M, Wu C, Qian C, Fortes P, Prieto J. *In vitro* and *in vivo* comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther*. Marzo de 2003; 7(3):375-85.
- 30 Kuriyama S, Yoshikawa M, Ishizaka S, Tsujii T, Ikenaka K, Kagawa T, Morita N, Mikoshiba K. A potential approach for gene therapy targeting hepatoma using a liver-specific promoter on a retroviral vector. *Cell Struct Funct*. Diciembre de 1991; 16(6):503-10.
- 35 Le M, Okuyama T, Cai SR, Kennedy SC, Bowling WM, Flye MW, Ponder KP. Therapeutic levels of functional human factor X in rats after retroviral-mediated hepatic gene therapy. *Blood*. 15 de febrero de 1997; 89(4):1254-9.
- Lemken ML, Wybraniec WA, Schmidt U, Graepler F, Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM. Expression liver-directed genes by employing synthetic transcriptional control units. *World J Gastroenterol*. 14 de septiembre de 2005; 11(34):5295-302.
- 40 Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*. Julio de 1999; 6(7):1258-66.
- 45 Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med*. Marzo de 2006; 12(3):342-7.
- 50 Manzini S, Vargiolu A, Stehle IM, Bacci ML, Cerrito MG, Giovannoni R, Zannoni A, Bianco MR, Forni M, Donini P, Papa M, Lipps HJ, Lavitrano M. Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21 de noviembre de 2006; 103(47):17672-7.
- 55 Miao CH, Ohashi K, Patijn GA, Meuse L, Ye X, Thompson AR, Kay MA. Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*. *Mol Ther*. Junio de 2000; 1(6):522-32.
- Miao CH, Thompson AR, Loeb K, Ye X. Long-term and therapeutic-level hepatic gene expression of human factor IX after naked plasmid transfer *in vivo*. *Mol Ther*. Junio de 2001; 3(6):947-57.
- 60 Miller AD. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther*. Primavera de 1990; 1(1):5-14.
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 12 de abril de 1996; 272(5259):263-7.

- Papatsenko DA, Makeev VJ, Lifanov AP, Régnier M, Nazina AG, Desplan C. Extraction of functional binding sites from unique regulatory regions: the *Drosophila* early developmental enhancers. *Genome Res.* Marzo de 2002; 12(3):470-81.
- 5 Pastore L, Morral N, Zhou H, Garcia R, Parks RJ, Kochanek S, Graham FL, Lee B, Beaudet *al.* Use of a liver-specific promoter reduces immune response to the transgene in adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 20 de julio de 1999; 10(11):1773-81.
- 10 Pilpel Y, Sudarsanam P, Church GM. Identifying regulatory networks by combinatorial analysis of promoter elements. *Nat Genet.* Octubre de 2001; 29(2):153-9.
- Prieto J, Herraiz M, Sangro B, Qian C, Mazzolini G, Melero I, Ruiz J. The promise of gene therapy in gastrointestinal and liver diseases. *Gut* 2003; 52(Supl. II):ii49-ii54.
- 15 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a ed., Cold Spring Harbor Press, Plainsview, Nueva York (1989).
- Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* Abril de 2004; 50(1):51-70.
- 20 Shen RF, Clift SM, DeMayo JL, Sifers RN, Finegold MJ, Woo SL. Tissue-specific regulation of human alpha 1-antitrypsin gene expression in transgenic mice. *DNA.* Marzo de 1989; 8(2):101-8.
- 25 Simonet WS, Bucay N, Lauer SJ, Taylor JM. A far-downstream hepatocyte-specific control region directs expression of the linked human apolipoprotein E and C-I genes in transgenic mice. *J Biol Chem.* 15 de abril de 1993; 268(11):8221-9.
- 30 Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* Enero de 1999; 5(1):64-70.
- Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* 2003; 3:545-565.
- 35 Trapnell BC. Adenoviral vectors for gene transfer. *Adv. Drug Del. Rev.* 1993 12: 185-199.
- VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, Follenzi A, Moons L, Berneman Z, Collen D, Chuah MK. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells *in vivo*. *Blood.* 1 de agosto de 2002; 100(3):813-22.
- 40 VandenDriessche T, Thorrez L, Acosta-Sanchez A, Petrus I, Wang L, Ma L, De Waele L, Iwasaki Y, Gillijns V, Wilson JM, Collen D, Chuah MK. Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy. *J Thromb Haemost.* Enero de 2007; 5(1):16-24.
- 45 Villa E, Grottola A, Buttafoco P, Colantoni A, Bagni A, Ferretti I, Cremonini C, Bertani H, Manenti F. High doses of alpha-interferon are required in chronic hepatitis due to coinfection with hepatitis B virus and hepatitis C virus: long term results of a prospective randomized trial. *Am J Gastroenterol.* Octubre de 2001; 96(10):2973-7.
- 50 Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L, Wilson DR. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther.* Julio-agosto de 1999; 6(4):367-72.
- Xia D, Zhang MM, Yan LN. Recent advances in liver-directed gene transfer vectors. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* Agosto de 2004; 3(3):332-6.
- 55 Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah MK, VandenDriessche T, Fukuda H, Kondo A, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S. Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol.* Agosto de 2003; 21(8):885-90.
- 60 Yull FE, Wallace RM, Clark AJ. Restricted tissue-specific but correct developmental expression mediated by a short human alpha 1AT promoter fragment in transgenic mice. *Transgenic Res.* Enero de 1995; 4(1):70-4.
- Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther.* 1 de julio de 1999; 10(10):1735-7.
- 65

ES 2 746 907 T3

Listado de secuencias

5	<110> VIB VZW LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW UNIVERSITEIT GENT	
	<120> Elementos reguladores de ácido nucleico específicos de hígado y métodos y uso de los mismos	
10	<130> MCH/ENH/V282	
	<150> US 61/125181 <151> 22-04-2008	
15	<160> 40	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1 <211> 88 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
	ggagttgctg gtgcttcccc aggctggaga ttgagttaat attaacaggc ccaaggcgat	60
25	gtgggcttgt gcaatcatag gcccggcc	88
	<210> 2 <211> 41 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 2	
	atcgccaggc cacctgagga gttaatgaat acatatctcc t	41
35	<210> 3 <211> 72 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 3	
	gggggaggct gctggtgaat attaaccaag gtcacccag ttatcggagg agcaaacagg	60
	ggctaagtc ac	72
45	<210> 4 <211> 71 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 4	
	tgaatgacct tcagcctggt cccgtccctg atatgggcaa acattgcaag cagcaaacag	60
	caaacacata g	71
55	<210> 5 <211> 173 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 5	

ES 2 746 907 T3

	ggcgtattct taagaataga ttaaataatc ataaaaagat ctataactta aaattgaaaa	60
	atgcttaaat attaaaaattc ttctcataaa aaaatactaa tttaaaaatg agcctgaaat	120
	gtttatctat ttattgcaca gggttgcata cataaaacga cacaccctct tgt	173
5	<210> 6 <211> 551 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
	agtttggaac aagactatat accatatcct acaggaagaa taaaagtaaa ggaaagggtgc	60
	catctctact gaatagagag tcctaacaaa aaggcttcaa aaggactctg catctttaat	120
	aatataaaaa ggctaggaca caaacagcat catctaaaat gccattagaa atacttcaca	180
	tacaaaaagg tctaagtaaa gcaggatttt ataaagtgat caaaaaagaa aactaaggg	240
	ggaaaaatct ttaagatta aagaggtttt tcaaaggaca agttgaagtg gctgtaaaat	300
	ttatgaggca gcattaaact tcagttctaa gtaacaataa attattcacc ataaaaacat	360
	acatgtgtca aatattataa gcctcttaaa ctttttaaaa caatttcttg cagaactgat	420
	tagatatatt aagtcaagat tagcagatac taactttttc attagcatac tatgatcact	480
	cagagtaaag gaggaatttt agaaaagaaa taagacagaa ccatcaatag tcgattcacc	540
10	accaaattgtg a	551
15	<210> 7 <211> 94 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7	
	ctaaaatggg caaacattgc aagcagcaaa cagcaaacac acagccctcc ctgcctgctg	60
20	accttgagc tggggcagag gtcagagacc tctc	94
25	<210> 8 <211> 101 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
	cagccaatga aatacaaaga tgagtctagt taataatcta caattattgg ttaaagaagt	60
30	atattagtgc taatttcctt ccgtttgtcc tagcttttct c	101
35	<210> 9 <211> 135 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 9	
	gcatgatttt aaggactggt tgtttatgag ccaatcagag gtgttgaata aacacctccc	60
	tactaggtca aggtagaaag gggagggcaa atattggaaa aaaaaacat gatgagaagt	120
	ctataaaaaat tgtgt	135

ES 2 746 907 T3

5	<210> 10	
	<211> 141	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 10	
	tgcgggaatc agcctttgaa acgatggcca acagcagcta ataataaacc agtaatttgg	60
	gatagacgag tagcaagagg gcattgggtg gtgggtcacc ctctttctca gaacacatta	120
	taaaaacctt ccgtttccac a	141
15	<210> 11	
	<211> 74	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 11	
	tgccactcct agttcccatc ctattttaat ctgcaagagg tttggttaat cattggcttt	60
	gtcctgtgta gaca	74
25	<210> 12	
	<211> 441	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 12	
	ttccttcccc cttccaagac cccctgaat cctatcaaaa gcacatcttc cattcattgc	60
	ttcccggtgt cattatgaca agcggctaca aatcaatagc agagggaaag gcaggaccaa	120
	cccgcaactca ccaagtgata aagattcact ctacagcccc atttgctaata agcccataat	180
	agcagccatt ggcgccccgc attaaataat acatttctact ccgcgtttat tatgggattt	240
	ttaaaactcc tcaccaaatt ggattttctc gatggtctct aatttccaca tttatcattt	300
	aaaattaaac tgctctgtgg aaagggggga tagagaagaa gaaggtagag agaggccaga	360
	cagtactgta tttttccttt tgactcccc ctttatgaaa acccataaat aatatcaggt	420
	atcacagcta taagcagcag g	441
35	<210> 13	
	<211> 171	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 13	
	aggaggaact gctcaaaaca gacagaggct ctttgtttgc tttgcttctg tgtcaactgg	60
	gcaacatttg gaaacaacaa atattgggtc agaggccac tgctttctta ccacctcct	120
	gctgggtcagc ttttccagct ttctgtcacg tacacacaag cgcagctatt t	171
45	<210> 14	
	<211> 170	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 14	

ES 2 746 907 T3

	cgatgctcta atctctctag acaagggtca tatttgatg ggttacttat tctctctttg	60
	ttgactaagt caataatoag aatcagcagg ttgacagca gattggcagg gataagcagc	120
	ctagctcagg agaagtgagt ataaaagccc caggctggga gcagccatca	170
5	<210> 15 <211> 48 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador directo	
	<400> 15	
15	aagcgccgc ggtaccgtct gtctgcacat tctgtagagc gagtgctc	48
	<210> 16 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> Cebador inverso	
	<400> 16	
25	agcgctagcc aggagcttgt ggatcttgt gacggc	36
	<210> 17 <211> 223 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> Secuencia TTRmin	
35	<400> 17	
	gtctgtctgc acatttcgta gagcgagtgt tccgatactc taatctccct aggcaagggt	60
	catatttggt taggttactt attctccttt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca	120
	ggtttgaggt cagcttgga gggatcagca gcttgggttg gaaggagggg gtataaaagc	180
40	cccttcacca ggagaagccg tcacacagat ccacaagctc ctg	223
	<210> 18 <211> 114 <212> ADN <213> artificial	
45	<220> <223> SEQ ID NO: 1 con sitio de restricción	
50	<400> 18	
	ggtaccggcg cgccggagtt gctggtgctt cccaggtcg gagattgagt taatattaac	60
	aggcccaagg cgatgtgggc ttgtgcaatc ataggcccg ccacgcgtgg tacc	114
55	<210> 19 <211> 67 <212> ADN	

ES 2 746 907 T3

	<213> artificial	
	<220>	
5	<223> SEQ ID NO: 2 con sitio de restricción	
	<400> 19	
	ggtaccggcg cgccatcgcc aggtcacctg aggagttaat gaatacatat ctcctacg	60
	tggtacc	67
10	<210> 20	
	<211> 98	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> SEQ ID NO: 3 con sitio de restricción	
	<400> 20	
	ggtaccggcg cgccggggga ggctgctggg gaatattaac caaggtcacc ccagttatcg	60
20	gaggagcaaa caggggctaa gtccacacgc gtggtacc	98
	<210> 21	
	<211> 97	
	<212> ADN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> SEQ ID NO: 4 con sitio de restricción	
30	<400> 21	
	ggtaccggcg cgctgaatg accttcagcc tgttcccgtc cctgatatgg gcaaacattg	60
	caagcagcaa acagcaaaca catagacgcg tggtacc	97
35	<210> 22	
	<211> 199	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> SEQ ID NO: 5 con sitio de restricción	
	<400> 22	
	ggtaccggcg cgccggcgta ttcttaagaa tagattaaat aatcataaaa agatctatac	60
	ttaaaaattg aaaaatgctt aaatattaaa attcttctca taaaaaaata ctaattttaa	120
	aatgagcctg aaatgtttat ctatttattg cacagggttg catacataaa acgacacacc	180
45	ctcttgtagc cgtggtacc	199
	<210> 23	
	<211> 576	
	<212> ADN	
50	<213> artificial	
	<220>	
	<223> SEQ ID NO: 6 con sitio de restricción	
	<400> 23	

ES 2 746 907 T3

	ggtaccggcg cgccagtttg gaacaagact atataccata tcctacagga agaataaaaag	60
	taaaggaaaag gtgccatctc tactgaatag agagtcttaa caaaaaggct tcaaaaggac	120
	tctgcatctt taataatata aaaaggctag gacacaaaaca gcatcatcta aaatgccatt	180
	agaaatactt cacatacaaa aagggtctaag taaagcagga ttttataaag tgatcaaaaa	240
	agaaacacta agggggaaaa atcttttaag attaaagagg tttttcaaag gacaagttga	300
	agtggctgta aaatttatga ggcagcatta aacttcagtt ctaagtaaca ataaattatt	360
	caccataaaa acatacatgt gtcaaataatt ataagcctct taaacttttt aaaacaattt	420
	cttgcagaac tgattagata tattaagtca agattagcag atactaactt tttcattagc	480
	atactatgat cactcagagt aaaggaggaa atttagaaaa gaaataagac agaaccatca	540
	atagtcgatt caccacaaaa tgtgacgcgt ggtacc	576
5	<210> 24 <211> 119 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> SEQ ID NO: 7 con sitio de restricción	
	<400> 24	
	ggtaccggcg cgctaaaaat gggcaaacat tgcaagcagc aaacagcaaa cacacagccc	60
15	tcctgcctg ctgaccttgg agctggggca gaggtcagag acctctcagc cgtgggtacc	119
	<210> 25 <211> 126 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> SEQ ID NO: 8 con sitio de restricción	
	<400> 25	
25	ggtaccggcg cgccagccaa tgaaatacaa agatgagtct agttaataat ctacaattat	60
	tggttaaaga agtatattag tgctaatttc cctccgtttg tcctagcttt tctcagcgt	120
	ggtacc	126
	<210> 26 <211> 161 <212> ADN <213> artificial	
30	<220> <223> SEQ ID NO: 9 con sitio de restricción	
35	<400> 26	
	ggtaccggcg cgccgcatga ttttaaggac tggttgttta tgagccaatc agaggtgttg	60
	aataaacacc tcctactag gtcaaggtag aaaggggagg gcaaataattg gaaaaaaaaa	120
	acatgatgag aagtcataaa aaattgtgta cgcgtggtac c	161

ES 2 746 907 T3

<210> 27
 <211> 166
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 10 con sitio de restricción
 <400> 27
 10
 ggtaccggcg cgctgcggg aatcagcctt tgaaacgatg gccaacagca gctaataata 60
 aaccagtaat ttgggataga cgagtagcaa gagggcattg gttggtgggt caccctcctt 120
 ctcagaacac attataaaaa ccttcggtt ccacacgcgt ggtacc 166
 <210> 28
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 11 con sitio de restricción
 20
 <400> 28
 ggtaccggcg cgctgccac tctagttcc catcctatct aaatctgcaa gaggtttggt 60
 taatcattgg ctttgtcctg ttagacacg cgtggtacc 99
 25
 <210> 29
 <211> 467
 <212> ADN
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 12 con sitio de restricción
 <400> 29
 35
 ggtaccggcg cgcttcctt ccccttcca agacccccct gaatcctatc aaaagcacat 60
 cttccattca ttgcttccg gtgtcattat gacaagcggc tacaatcaa tagcagagg 120
 aaaggcagga ccaaccgca ctcaccaagt gataaagatt cactctcagc cccgatttgc 180
 taatagccca taatagcagc cattggcgcc ccgcattaaa taatacattt cactccgct 240
 ttattatggg atttttaaaa ctctcacca aattggattt tctcgatggt ctctaatttc 300
 cacatttata atttaaaatt aaactgctct gtggaaaggg gggatagaga agaagaagg 360
 agagagaggc cagacagtac tgtatcttct cttttgactc ccccttttat gaaaaccat 420
 aaataatata aggtatcaca gctataagca gcaggacgcg tgggtacc 467
 <210> 30
 <211> 197
 <212> ADN
 <213> artificial
 40
 <220>
 <223> SEQ ID NO: 13 con sitio de restricción
 45
 <400> 30

ES 2 746 907 T3

	ggtagcggcg cgccaggagg aactgctcaa aacagacaga ggctctttgt ttgctttgct	60
	tctgtgtcaa ctgggcaaca ttgggaaaca acaaattattg gttcagaggc ccactgcttt	120
	cttaccacacc tctgtctggt cagcttttcc agcttttctg cacgtacaca caagcgcagc	180
	tatttacgcg tggtagc	197
5	<210> 31 <211> 194 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> SEQ ID NO: 14 con sitio de restricción	
	<400> 31	
	ggtagcggcg cgccgatgct ctaatctctc tagacaagggt tcatatttgt atgggttact	60
	tattctctct ttgttgacta agtcaataat cagaatcagc aggtttgcag tcagattggc	120
	agggataagc agcctagctc aggagaagtg agtataaaag cccaggctg ggagcagcca	180
15	tcacgcgtgg tagc	194
20	<210> 32 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo	
25	<400> 32	
	agggatatcg acttcagaa aa	22
30	<210> 33 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sonda	
	<400> 33	
40	agtcctgtga accagcagtg ccatttc	27
45	<210> 34 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso	
50	<400> 34	
	gtgagcttag aagttgtga aacag	25
55	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 746 907 T3

	<220> <223> Cebador directo	
5	<400> 35 gccttctagt tgccagccat	20
10	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sonda <400> 36	
20	tgtttgcccc tccccggtgc	20
25	<210> 37 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador inverso <400> 37 ggcaccttcc aggtcaag	19
35	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador directo <400> 38 tgtgtccgtc gtggatctga	20
45	<210> 39 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sonda <400> 39	
55	cctggagaaa cctgccaagt atgatgaca	29
60	<210> 40 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador inverso <400> 40 cctgcttcac caccttcttg a	21

REIVINDICACIONES

1. Un elemento regulador de ácido nucleico de 90 nucleótidos o menos para potenciar la expresión génica específica de hígado, que comprende la SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 3.
2. Un elemento regulador de ácido nucleico de 90 nucleótidos o menos que hibrida en condiciones rigurosas con el elemento regulador de la reivindicación 1 o con su complemento que tiene la actividad de potenciar la expresión génica específica de hígado.
3. Un casete de expresión de ácido nucleico que consiste en el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, unido de forma funcional a un promotor y un transgén, y una secuencia de poliadenilación, en el que dicho elemento regulador de ácido nucleico no forma parte de una región reguladora más grande.
4. Un casete de expresión de ácido nucleico que comprende dos o más elementos reguladores de ácido nucleico para potenciar la expresión génica específica de hígado, unido de forma funcional a un promotor y un transgén, seleccionándose dichos dos o más elementos reguladores de ácido nucleico del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, o una secuencia que tiene un 95 % de identidad con cualquiera de estas secuencias, y en el que uno de los dos o más elementos reguladores de ácido nucleico consiste en la SEQ ID NO: 3, una secuencia que tiene un 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 3 y en el que dichos dos o más elementos reguladores no forman parte de una región reguladora más grande y la longitud de los elementos reguladores totales no excede de 600 nucleótidos.
5. El casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los dos o más elementos reguladores son idénticos.
6. El casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el promotor es un promotor específico de hígado.
7. El casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el promotor es el promotor de transtiretina (TTR).
8. El casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que el promotor es un promotor mínimo.
9. El casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que el transgén codifica una proteína.
10. El casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la proteína es un factor de coagulación, más particularmente el factor IX.
11. Un vector que comprende el casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10.
12. El vector de acuerdo con la reivindicación 11, que es un vector vírico, más particularmente un vector lentivírico o AAV.
13. Una composición farmacéutica que comprende el elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o el casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10 o el vector de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. El elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o el casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, o el vector de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en genoterapia.
15. El elemento regulador de ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o el casete de expresión de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, o el vector de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de hemofilia, más particularmente hemofilia B.

Figura 1

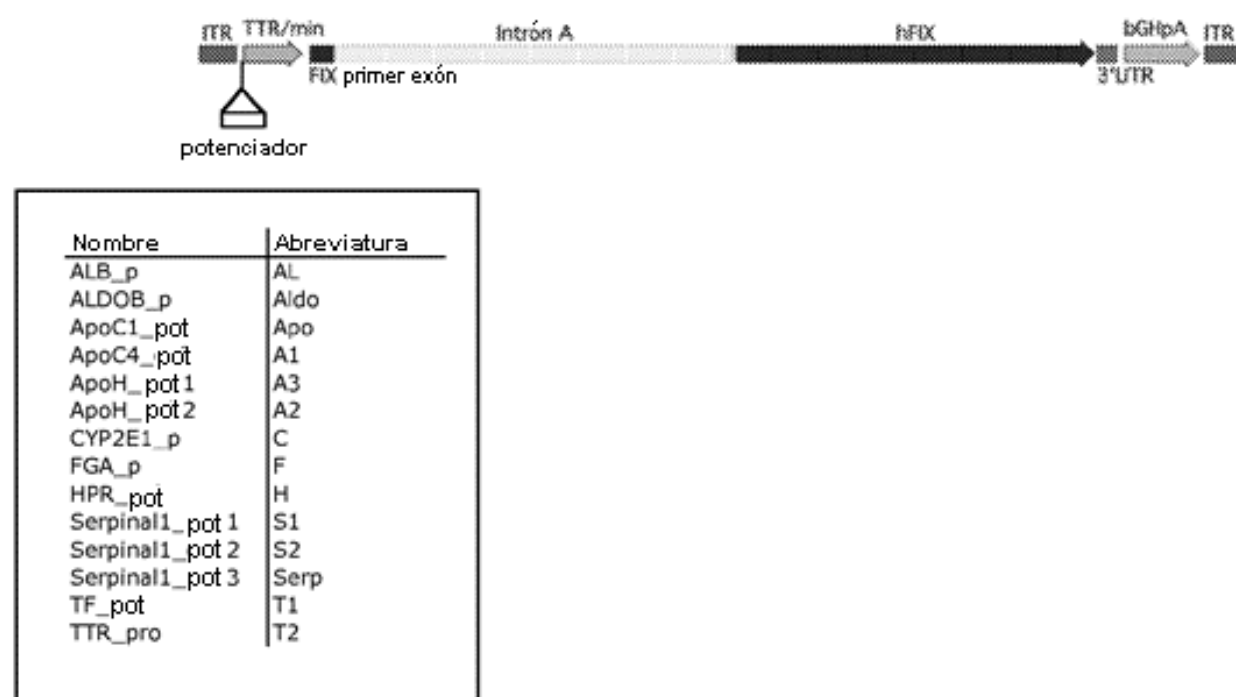


Figura 2

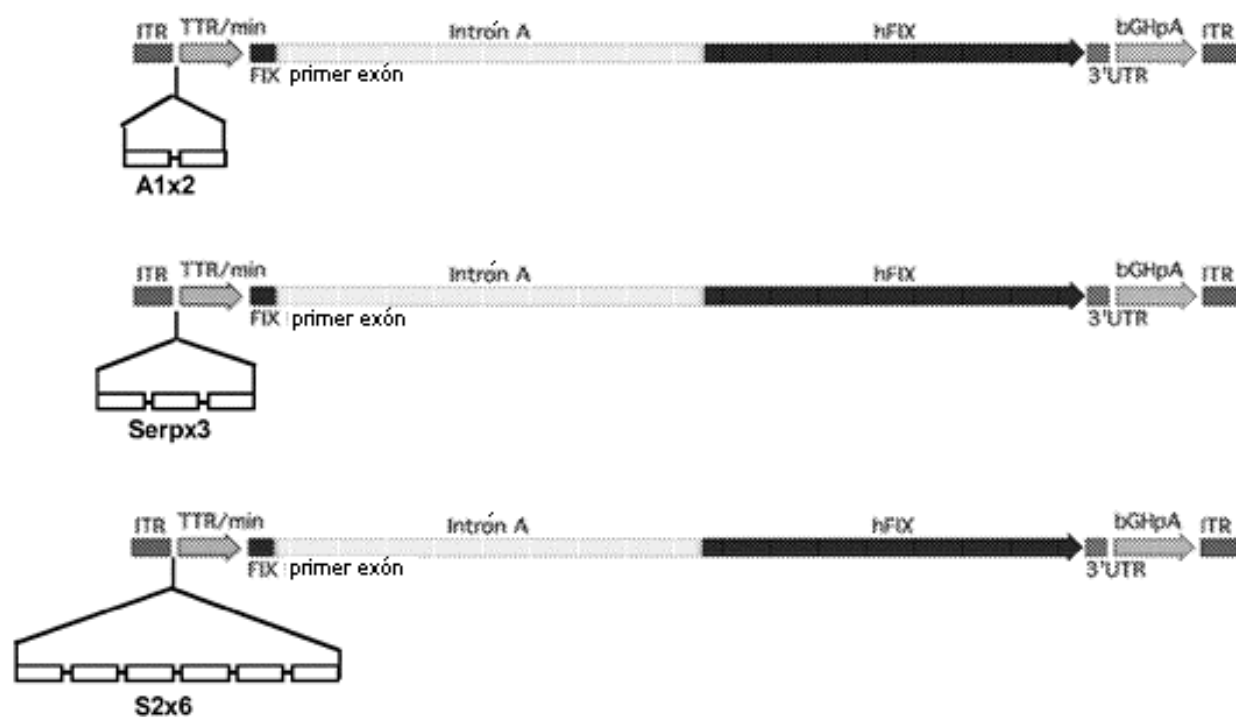


Figura 3

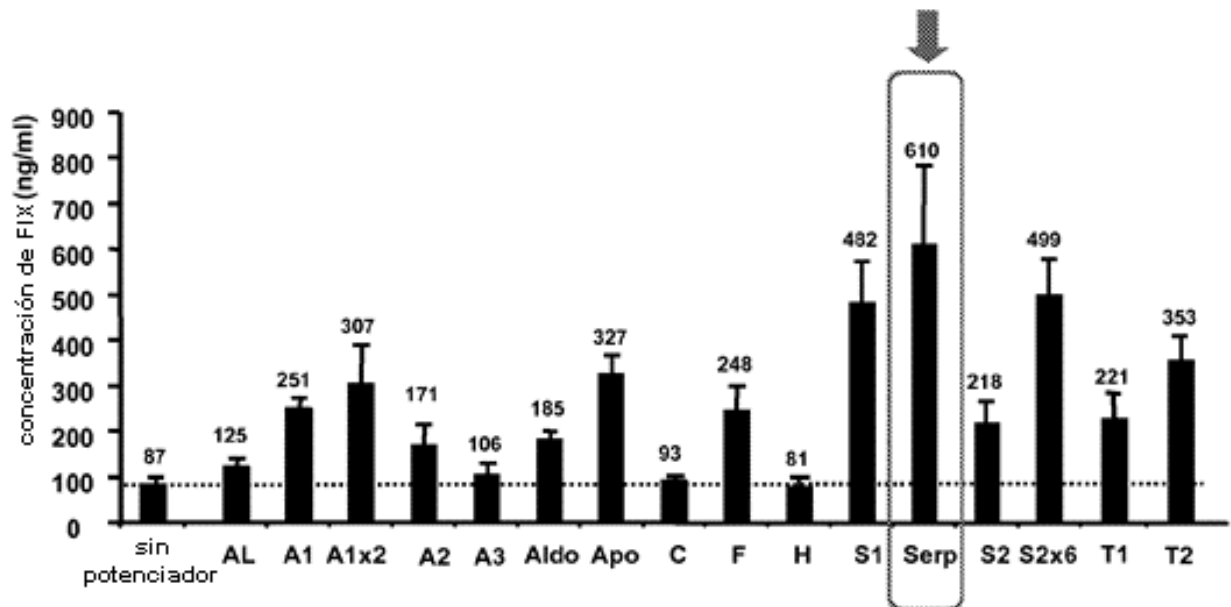


Figura 4

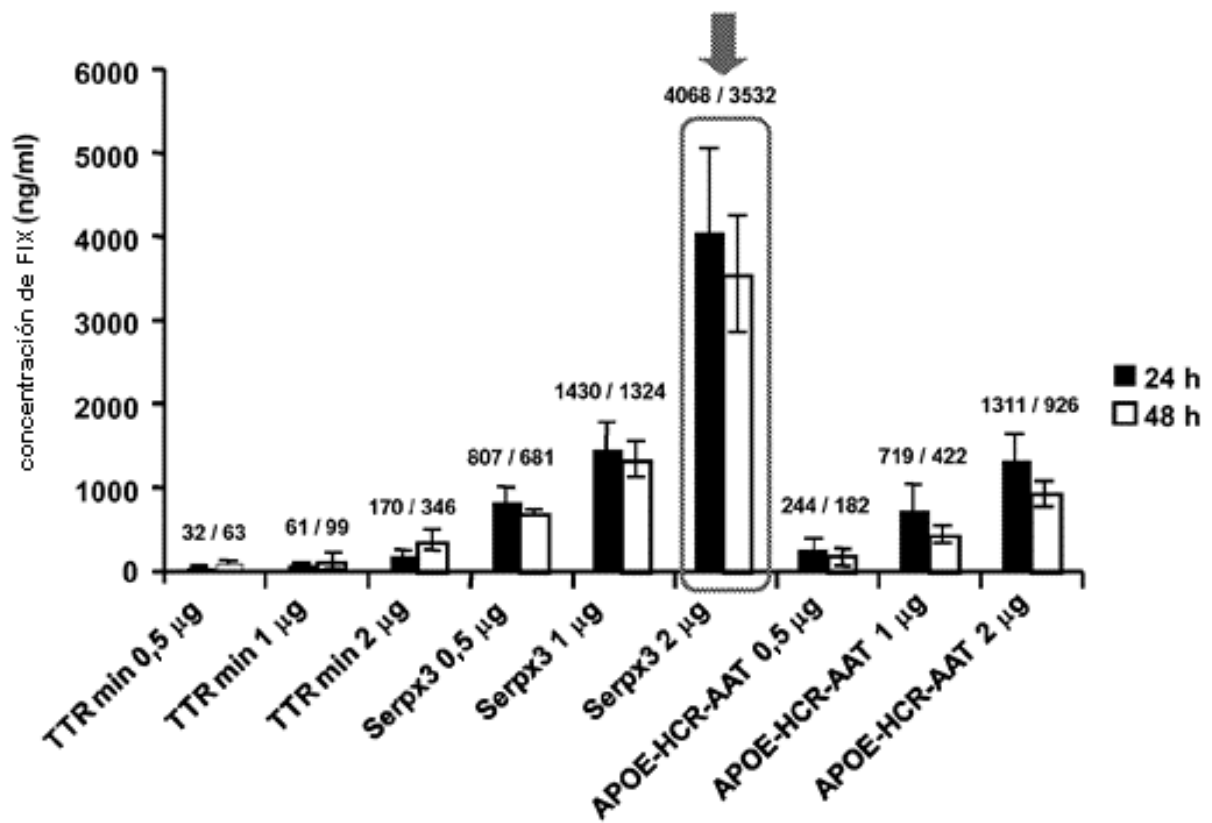


Figura 5

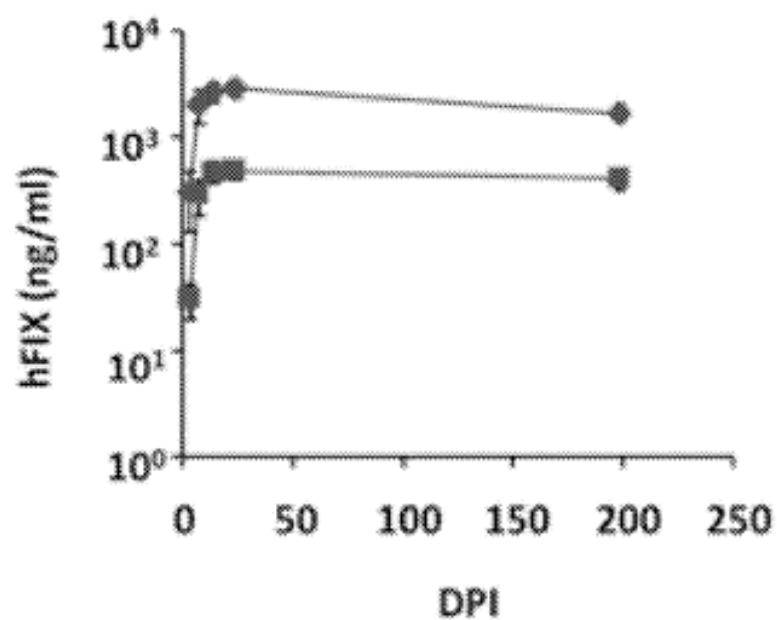


Figura 6

