

G. HOLLMANN RESTREPO

ABOGADOS LT

199 1/2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 04129329 00000003 Folios: 03
Fecha (GUB): 2005-05-27 15:49:36
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 444 RESPUESTA
Inventor: 220 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

56636

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. 04129329

Solicitud de patente PCT fase nacional

Solicitud internacional No. PCT/US03/16741

Titular: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

Yo, LUIS PATIÑO LEYVA, vecino de Bogotá, D. C., portador de la tarjeta profesional No. 2698, obrando como apoderado sustituto del solicitante, en la solicitud de patente de la referencia, doy respuesta al Oficio No. 12021, notificado por fijación en lista en Febrero 4 de 2005, cuyo término fue prorrogado mediante memorial radicado el 21 de Abril de 2005, en los siguientes términos:

1. De acuerdo con el Oficio arriba citado, estoy presentando, aquí anexa, la traducción al castellano del texto de la solicitud de patente PCT/EP03/16741, tal como fue publicada bajo el número WO 03/102135; la única diferencia que tiene con respecto al texto que se presentó originalmente consiste en:

a. en la página 75, líneas 5 y 7 se ha dejado (SEQ ID No.), sin agregarle el número de la secuencia (en el primer caso es la secuencia No. 5 y en el segundo es la secuencia No. 4), ya que estos números no se habían incluido y fueron agregados para la presentación en Colombia.

2. Teniendo en cuenta lo expresado por el solicitante, no se efectuaron otros cambios entre la presentación de la solicitud PCT y la iniciación de la fase nacional en Colombia.

Acompaño al presente memorial la sustitución del Poder a mi favor para este caso.

En vista de lo anterior solicito se sirva continuar con el trámite de esta solicitud de patente.

De la señora Jefe,

Atentamente,



LUIS PATIÑO LEYVA
CC 2.930.616 de Bogotá
T.P. No. 2698

200 7

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 04129329 00000003 Folios: 49
Fecha (MM): 2005-05-27 15:49:26
Título: PATENTE DE INVENCIÓN PARA UNA COMPOSICIÓN DE UN PRODUCTO DE CUIDADO DE LA PIEL
Dependencia: DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REF: Expediente No. 04129329

Solicitud de patente PCT fase nacional

Solicitud internacional No. PCT/US03/16741

Titular: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

Yo, **GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO**, mayor de edad, domiciliado en Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 5903, atentamente digo a usted, que sustituyo el poder con que obro al doctor **LUIS PATIÑO LEYVA**, domiciliado en Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 2698, con las mismas facultades con que me fue conferido para este caso.

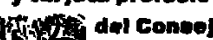
Señor Superintendente,


GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO
C.C. No. 2.878.023 de Bogotá
T.P. No. 5903

Acepto la sustitución,


LUIS PATIÑO LEYVA
C.C. No. 2.930.616 de Bogotá
T.P. No. 2698

AUTENTICACIÓN DE FIRMA
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.R.C. mod. Decr. 2282 de 1969, art. 1 mod. 30)
Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:

identificado con C.C. 
expedida en:  y tarjeta profesio-
nal de abogado(a) No.  del Consejo
Superior de la Judicatura, con documento di-
rigido a 
y declaró que  puesta en este escrito es
suya.

Firma del declarante
En Bogotá D.C. a 
AUTORIZÓ ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO



- (12) Publicación de la solicitud internacional bajo PCT
 (19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
 Oficina Internacional
 (43) Fecha de publicación internacional : 11 de diciembre de 2003
 (11-12-2003)
 (10) Número de publicación internacional: **WO 03/102135 A2**
-
- (51) Clasificación Internacional de patentes: **C 12 N**
 (21) Número de solicitud internacional: **PCT/US03/16741**
 (22) Fecha de presentación internacional: **28 de mayo de 2003 (28.03.2003)**
 (25) Idioma de la presentación: **inglés**
 (26) Idioma de la publicación: **inglés**
 (30) Antecedentes de prioridad: **60/384,108 31 de mayo de 2002 (31.05.2002) US**
 (71) Solicitante (para todos los estados designados excepto US): **SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE], Müllerstrasse 178, 13342 Berlin (DE).**
 (72) Inventor; e
 (75) Inventores/solicitantes (solo para US): **JAN, Junliang [DE/DE], 1220 Brewster Drive, El Cerrito, CA 94530 (US). WU, Qingyu [CN/US]: 1153 Camino Vallecito, Lafayette, CA 94549-2844 (US).**
 (74) Agente: **WASHTIEN, Wendy, L.; Berlex Biosciences, 2600 Hilltop Drive, P. O. Box 4099, Richmond, CA 94804 (US)**
 (81) Estados designados (nacional): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**
 (84) Estados designados (regional): **Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**
- Publicado:**
 - sin informe de búsqueda internacional y a ser publicado nuevamente después de recibido el informe
- Véanse las explicaciones („Guidance Notes on Codes an Abbreviations”) al comienzo de cada edición regular de la Gaceta-PCT para la explicación del código de dos dígitos y de las otras abreviaturas
-
- (54) Título: **Secuencias de control del gen de corlina humano**

(57) Resumen: Nueva región de control de la expresión aislada de genes de corina de mamífero. Esta región de control activa preferencialmente la transcripción en células cardíacas. Se proveen métodos y composiciones para emplear esta región de control en la identificación de agentes capaces de modular la expresión de corina y en el tratamiento de enfermedades cardíacas.

SECUENCIAS DE CONTROL DEL GEN DE CORINA HUMANO

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N°: 60/384.108, presentada el 31 de mayo, 2002, cuyo contenido se incorpora por completo en este documento a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

Esta invención provee una nueva región de control de la expresión aislada de genes de corina de mamíferos. Esta región de control activa preferencialmente la transcripción en células cardíacas. Se proveen métodos y composiciones para emplear esta región de control en la identificación de agentes capaces de modular la expresión de corina y en el tratamiento de enfermedades cardíacas.

ANTECEDENTES

La corina, una serina proteasa transmembrana cardíaca, cumple una función importante en la conversión de péptidos natriuréticos pro-atriales (pro-ANP) en ANP (Yan, W. et al. (2000) *PNAS*, 97: 8525-8529; Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 16900-16905). La ANP es una hormona cardíaca que reduce la presión sanguínea elevada promoviendo la excreción de sales, incrementando la producción urinaria, disminuyendo el volumen sanguíneo y relajando la tensión de los vasos de una manera dependiente del receptor. La ANP se ha relacionado con las principales enfermedades cardiovasculares tal como hipertensión e insuficiencia cardíaca (Burnett, J.C. et al.

(1986) *Science*, 231: 1145-1147). En ratones noqueados, una deficiencia ya sea de la ANP o de su receptor causa una hipertensión espontánea (John, S.W. et al. (1995) *Science* 267: 679-681; John, S.W. et al. (1996) *Am. J. Physiol.* 271, R109-R114; Lopez et al. (1995) *Nature* 378: 65-68). Se considera que el paso de activación de la conversión de pro-ANP en ANP es crítico en la regulación de la hormona cardíaca.

La corina tiene una estructura predicha de una proteína transmembrana de tipo II que contiene dos motivos ricos en cisteína tipo *frizzled*, ocho repeticiones del receptor de LDL, un dominio tipo receptor del secuestrante de macrófagos y un dominio de proteasa tipo tripsina en la región extracelular (Yan et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 14926-14935). La topología general de la corina es similar a la de otras serina proteasas transmembrana de tipo II incluyendo hepsina, enteroquinasa, MT-SP1/matriptasa, proteasa tipo tripsina de la vías respiratorias humanas, TMPRSS2, TMPRSS3/TADG-12, TMPRSS4, MSPL y *Stubble-stubblويد*. Las topologías similares así como las distintas estructuras modulares sugieren que estas proteínas comprenden una familia de genes que evolucionó por duplicación y reordenamiento de exones ancestrales.

El gen humano abarca > 200 kb y contiene 22 exones. Los límites de intrones/exones están bien conservados entre las

especies, donde la mayoría de los exones codifican dominios estructurales. Se ha descrito previamente la clonación, tanto en ratones como en humanos, del ADNc que codifica la proteína corina (Yan et al. *ibid*). El análisis de transferencia Northern mostró que el ARNm de la corina es de gran expresión en el corazón de seres humanos. El análisis por hibridación con fluorescencia *in situ* permitió mapear el gen de la corina humana en el brazo corto del cromosoma 4 (4p12-13), donde se había localizado previamente el locus de una enfermedad cardíaca congénita que presenta un retorno venoso pulmonar completamente anómalo.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el aislamiento, la clonación y la identificación de las regiones de control de la expresión del gen de corina de mamíferos, incluyendo el promotor y otros elementos reguladores, y el uso de esta región de control de la expresión específica del corazón para identificar nuevos agentes que modulan la expresión del gen de corina y para tratar enfermedades cardíacas.

Para tal fin, uno de los objetos de la presente invención consiste en proveer un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina, donde dicha región de control modula la transcripción de cualquier polinucleótido heterólogo con el cual se liga

operativamente, incluyendo, a modo de ejemplo, el gen de corina humana.

La región de control de la expresión de la corina dirige la transcripción específica del corazón de los polinucleótidos heterólogos a los cuales está ligado operativamente, comprende uno o más elementos reguladores de la transcripción seleccionados del grupo formado por GATA, Tbx-5, NKx2.5, el factor de transcripción de tipo Krüppel o sitios de unión NF-AT, y tiene capacidad para unirse a las proteínas de la transcripción, por ejemplo GATA-4.

Otro objeto de la invención consiste en proveer polinucleótidos que comprenden una región de control de la expresión de corina humana. El polinucleótido preferido de la invención se localiza en los nucleótidos -4037 a -15 (SEQ ID N°: 6), más preferentemente en los nucleótidos -1297 a -15 (SEQ ID N°: 5) y más preferentemente aún en los nucleótidos -405 a -15 (SEQ ID N°: 4), donde dicha numeración es relativa al sitio de inicio de la traducción (ATG) del gen de corina humana o su cadena complementaria, tal como se muestra en la figura 8 (SEQ ID N°: 2).

De acuerdo con este aspecto de la invención también se proveen fragmentos y variantes de estos polinucleótidos.

Otro objeto de la invención consiste en proveer vectores que comprenden la región de control de la expresión de corina, o fragmentos o variantes de la misma. En otras

207
7

realizaciones, el vector también comprende un polinucleótido heterólogo, por ejemplo corina, ligado operativamente a la región de control de la expresión de corina. De acuerdo con este aspecto de la invención, también se proveen células huésped transfectadas con dichos vectores, y métodos para expresar los productos codificados por dichos polinucleótidos heterólogos.

Otro objeto de la invención consiste en proveer composiciones farmacéuticas que comprenden un vector que contiene la región de control de la expresión de corina ligada operativamente a un polinucleótido heterólogo o una célula huésped transfectada con dicho vector, en un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

Otro objeto de la invención consiste en proveer un método para identificar un agente que puede modular la expresión de un gen de corina humana en una célula, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante en el cual el polinucleótido aislado, que comprende una región de control de la expresión de la corina de mamífero, está ligado operativamente a un gen informante;

(b) transfectar la célula con el vector recombinante;

(c) tratar la célula con el agente;

(d) medir el nivel de transcripción de la secuencia informante en la célula tratada; y

208

(e) comparar el nivel de expresión de la secuencia informante en presencia del agente con el nivel de expresión en una célula transfectada control que no ha sido tratada con el agente.

En una realización preferida, se utilizan miocitos cardíacos.

Otro objeto de la invención consiste en proveer un método para modular la expresión de un gen específico del corazón en un sujeto humano, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante en el cual un polinucleótido aislado comprende una región de control de la expresión de la corina de mamíferos ligada operativamente a un polinucleótido heterólogo; y

(b) administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz en términos terapéuticos del vector.

Una realización preferida de este aspecto de la invención es un vector en el cual el polinucleótido heterólogo codifica corina. También son preferidas las realizaciones en las cuales la región de control de la expresión de corina se selecciona entre los polinucleótidos que poseen las secuencias de las SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°: 6.

Otro objeto de la invención consiste en proveer un método de tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión o infarto de miocardio en un sujeto

209

humano, donde dicho método comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz en términos terapéuticos de un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina, ligado operativamente a un gen seleccionado del grupo formado por corina, el péptido natriurético atrial (ANP), péptido natriurético de tipo B, fosfonolambano, enzima convertidora de angiotensina (ACE) o formas dominantes negativas de estos genes. Como alternativa, la región de control de la expresión de la corina puede estar ligada operativamente a un polinucleótido que codifica una molécula de ARN antisentido.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el gen seleccionado es corina.

Otro aspecto de la invención consiste en proveer un método de tratamiento de un sujeto humano que sufre de insuficiencia cardíaca, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante en el cual el polinucleótido aislado comprende una región de control de la expresión de la corina de mamífero, ligado operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido seleccionado del grupo formado por ANP, péptido natriurético de tipo B, fosfonolambano, ACE o formas dominantes negativas de estos genes; y

(b) administrar el vector recombinante, en un vehículo aceptable para uso farmacéutico, a dicho sujeto.

210
10
210

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Organización de los genes de corina de mamífero. Organización de los genes de corina (A) humanos y (B) de ratón. Se secuenciaron dos clones BAC con una estrategia de *shotgun* [o rifle] y se indican los tamaños de las secuencias ensambladas del inserto. Las barras verticales indican exones. El clon de plásmido usado para la subclonación del BAC 26540 en el gen humano está indicado con los sitios de enzimas de restricción (H, *Hind III*; E, *EcoRI*). El inserto del subclon fue secuenciado utilizando un método de extensión con cebadores que emplea secuenciación automática. En la parte inferior se muestran las posiciones de los clones BAC, Contig y un clon plásmido que abarca el gen de la corina.

Figura 2. Posiciones de los límites de intrones-exones con relación al dominio de la proteína corina. Los exones 1 a 22 (panel superior) del gen de corina están alineados con sus correspondientes dominios de proteína. TM, dominio transmembrana; *Frizzled*, el dominio rico en cisteína tipo *frizzled*; LDLR, repeticiones del receptor de LDL; SRCR, dominio rico en cisteína del receptor del secuestrante; H, D y S, los residuos His, Asp y Ser de la tríada catalítica del dominio de la proteasa.

Figura 3. Alineación de las regiones flanqueadoras 5' de los genes de corina humanos (SEQ ID N°: 1) y de ratón

(SEQ ID N°: 3). La región flanqueadora 5', el exón 1 y parte del intrón 1 están alineados entre los genes humano y de murino. La numeración es relativa al iniciador de la traducción ATG (fuente resaltada y en cursiva). Los números indicados son diferentes en humanos y ratones debido a la divergencia en los primeros exones. La flecha indica la unión entre el primer exón e intrón del gen de corina humano y la secuencia de procesamiento del donante del intrón 1 humano está subrayada. Las secuencias reguladoras putativas están indicadas y resaltadas (sitio Tbx5 para unión a Tbx5, una caja T que contiene al factor de transcripción; NF-AT, un sitio de unión para el factor nuclear de células T activadas; GATA, un elemento de unión para proteínas GATA; caja GT para la unión a factores tipo Krüppel; caja TATA para la unión al factor de transcripción basal TFIID; y NKE, un motivo de unión para Nkx2.5). La secuencia NKE, que se superpone con la secuencia GATA proximal, está subrayada.

Figura 4. Análisis funcional de la actividad del promotor del gen de corina en cardiomiocitos cultivados. Diagrama de las construcciones informantes que contienen segmentos truncados en serie de la región flanqueadora 5' de genes de corina humanos y de murinos ligados al gen de la luciferasa (Panel A). Se indican las ubicaciones de los elementos reguladores putativos. Estas construcciones fueron co-transfectadas en células HL-5 de ratón con pRL-SV40, un

plásmido que expresa luciferasa de *Rellina* dirigido por el promotor viral SV40. La actividad luciferasa expresada por cada construcción se normalizó con la actividad de la luciferasa de *Rellina* expresada por el pRL-SV40 para cada transfección. Cada experimento de transfección se realizó por triplicado para cada construcción. Los datos representan la media $\pm$ D.E. de tres experimentos independientes (Panel B).

Figura 5. Expresión específica del corazón de las secuencias flanqueadoras 5' de los genes de corina humanos y de murinos. Los cardiomiocitos HL5 y las células epiteloides HeLa fueron transfectadas con las construcciones indicadas, cada una junto con la construcción control pRL-SV40. Las actividades de luciferasa y *Rellina* se expresan como unidades de luz por alícuota de 20 μ l de los extractos celulares de las células transfectadas. Cada experimento de transfección se efectuó por triplicado. Los datos representan la media $\pm$ D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 6. Unión de proteínas nucleares a la secuencia reguladora que abarca el elemento GATA proximal.

A: Secuencias de los oligonucleótidos de la cadena superior usadas como sondas y competidores. Los motivos GATA en cada secuencia (SEQ ID N°: 11 y 13, para humanos y ratones, respectivamente) están resaltados y los nucleótidos

mutados (SEQ ID N°: 12 y 14, para humanos y ratones, respectivamente) están en cursiva. Los elementos GATA proximales de humanos y murinos son de las regiones indicadas de las secuencias flanqueadoras 5' de corina. La sonda consenso GATA (SEQ ID N°: 15) que contiene dos motivos GATA deriva de la región potenciadora específica del receptor de células T humanas.

B: La sonda consenso GATA marcada (SEQ ID N°: 15), o su sonda mutante (SEQ ID N°: 16), se incubó con extractos nucleares de células HL-5 en presencia o ausencia de un exceso de 100 veces de los oligonucleótidos no marcados indicados. La flecha indica un complejo de ADN-proteína dependiente de la secuencia GATA.

C: La sonda consenso GATA marcada se incubó con extractos nucleares de células HL-5 en presencia de anticuerpos contra proteínas GATA. La flecha indica el complejo de ADN-proteína cuya formación fue bloqueada por un anticuerpo contra GATA-4, pero no con anticuerpos contra GATA-1, -3 y -6.

D: El elemento GATA marcado de la corina humana se incubó con extractos nucleares de HL-5 en presencia o ausencia de un anticuerpo contra GATA-4. La flecha indica el complejo de ADN-proteína cuya formación fue bloqueada completamente en presencia del anticuerpo anti-GATA-4.

Figura 7. Análisis mutacional de los elementos GATA proximales conservados. Se introdujeron las mismas mutaciones (GATA en CTTA) que eliminan la unión de la proteína GATA-4 en EMSA en las construcciones informantes de luciferasa dirigidas por las regiones flanqueadoras 5' de -642 a -77 en ratón o de -405 a -15 en humano. Las construcciones mutantes y de tipo salvaje fueron transfectadas en células HL-5, cada una junto con la construcción control pRL-SV40. La actividad luciferasa expresada por cada construcción fue normalizada para la actividad luciferasa de Renilla expresada por pRL-SV40 para cada transfección. La actividad del promotor de cada construcción mutante se expresó como un porcentaje de la correspondiente construcción de tipo salvaje. Cada experimento de transfección se efectuó por triplicado. Los datos representan la media $\pm$ D.E. de tres experimentos independientes.

Figura 8. Secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°: 2) de la región flanqueadora 5' del gen de corina humano. La secuencia de 4165 pares de bases contiene la región flanqueadora 5', el primer exón y el comienzo del intrón 1 (en minúscula). Toda la numeración es relativa al sitio de inicio de la traducción (ATG, resaltado y subrayado). Los elementos reguladores putativos están resaltados. Las

abreviaturas de los elementos reguladores putativos se describieron en la leyenda de la figura 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el aislamiento, la clonación y la identificación de la región de control de la expresión del gen de corina específico del corazón, incluyendo el promotor y otros elementos reguladores. La región de control de la expresión de corina aislada, y fragmentos y variantes de la misma, son de utilidad en la construcción *in vitro* e *in vivo* de modelos experimentales para estudiar la modulación de la expresión del gen de corina y para identificar nuevos moduladores de la expresión del gen de corina. La región de control de la expresión también se puede usar en las terapias genéticas dirigidas a los estados de enfermedad del corazón, por ejemplo la insuficiencia cardíaca.

Definiciones

Tal como se utilizan en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado a continuación.

Un "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya sea en la forma de cadenas simples o dobles. El término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos

de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces modificados de la estructura principal, que son sintéticos, naturales y no naturales, que presentan propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que son metabolizados de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitaciones, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, péptidos-ácidos nucleicos (PNA).

A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida por residuos mixtos básicos y/o de desoxiinosina (Batzner et al. (1991) *Nucl. Acids Res.* 19: 5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2605-08; Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes*, 8: 91-98). El término ácido nucleico se usa indistintamente con los términos gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente "variantes de procesamiento". De manera similar, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de procesamiento de dicho ácido nucleico. Las "variantes de procesamiento", como lo sugiere su nombre, son los productos de procesamientos alternativos de un gen. Después de la transcripción, el transcripto inicial de ácido nucleico puede ser procesado de forma tal que los diferentes (alternativos) productos de procesamiento del ácido nucleico codifican distintos polipéptidos. Los mecanismos de producción de variantes de procesamiento varían, pero incluyen un procesamiento alternativo de exones. Los polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico por transcripción directa también están comprendidos por esta definición. Cualquiera de los productos de una reacción de procesamiento, incluyendo las formas recombinantes de los productos de procesamiento, está incluido en esta definición.

El "gen de corina" se refiere a un gen que codifica una secuencia de aminoácidos contiguos que comparten al menos un 60% aproximadamente (preferentemente un 75%, 78%, 90%, y más preferentemente un 95% aproximadamente) de identidad con la secuencia de aminoácidos del gen de corina humano descrito en Yan et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 14926-14935).

La "región de control de la expresión de corina" o la "región de control de la expresión" se refiere a un polinucleótido ubicado dentro de la secuencia genómica 5' con respecto a la región de codificación de los genes de corina de mamífero naturales. En el gen de corina humano, la región de control de la expresión de corina comienza por el nucleótido -4165 y termina en el nucleótido -15 con relación al sitio de inicio de la traducción (ATG) del gen de corina, o su cadena complementaria, tal como se muestra en la figura 8. La región de control de la expresión de la corina puede activar la transcripción del gen de corina en el tejido cardíaco (miocitos). Los polinucleótidos que comprenden la región de control de la expresión de la corina pueden variar en un rango de 100 a 5000 nucleótidos de longitud; las realizaciones particulares de la región de control de la expresión de la corina funcional humana son de 4023, 1283 ó 391 nucleótidos (SEQ ID N°: 6, 5 y 4, respectivamente) de longitud. Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina son en general al menos un 70% homólogos de estas secuencias. En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina son al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% o 100% homólogos de estas secuencias. El término "región de control" no incluye los codones de inicio o terminación y las otras secuencias ya descritas en Yan et al. *ibid.* La

región de control de la expresión de la corina contiene sitios de unión para diversas proteínas reguladoras de la transcripción, por ejemplo GATA-4, que se pueden ligar de una manera que es sustancialmente la misma que en la naturaleza o de una manera artificial. La región de control de la expresión de la corina activa la transcripción del gen de corina o de otros polinucleótidos heterólogos que están ligados operativamente a la misma, en particular de una manera específica del corazón.

La "expresión específica del corazón" significa que el polinucleótido se transcribe con un mayor índice en células derivadas del corazón que en las células no cardíacas. Por consiguiente, la región de control de la expresión de la corina generalmente activará la transcripción de un polinucleótido ligado con una eficacia al menos 2 veces mayor en miocitos cardíacos que en las células no cardíacas, donde la expresión en cada caso se normaliza para la transcripción de otros polinucleótidos ligados al promotor/potenciador SV40 u otro promotor constitutivo.

Una o más "variantes" de los polinucleótidos, tal como se utilizan aquí, son polinucleótidos que difieren de la secuencia de polinucleótidos de un polinucleótido de referencia. En general, las diferencias son limitadas de modo que las secuencias de polinucleótidos de la referencia y la variante son bastante similares en general y en muchas

regiones son idénticas. Las diferencias son tales que no se ve alterada la función del polinucleótido y, si el polinucleótido normalmente codifica un polipéptido, el polipéptido resultante no está cambiado en cuanto a secuencia de aminoácidos o, aunque posee diferencias en la secuencia de aminoácidos, aún es funcionalmente idéntico.

Los "fragmentos", tal como se utilizan aquí, se refieren a un polinucleótido cuya secuencia de polinucleótidos es enteramente la misma que una parte, pero no toda, la secuencia de polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina mencionada precedentemente y variantes de la misma. Dichos fragmentos conservan la capacidad de la región de control de la expresión de corina para dirigir una transcripción específica del corazón de los polinucleótidos heterólogos a los cuales están ligados operativamente.

Los "elementos de inicio de la transcripción" se refieren a las secuencias en un promotor que especifican el sitio de inicio de la ARN polimerasa II. Los elementos del inicio de la transcripción pueden incluir cajas TATA, que dirigen el inicio de la transcripción de unas 25-35 bases hacia el extremo 3', o elementos iniciadores, que son secuencias localizadas cerca del propio sitio de inicio de la transcripción. Los promotores eucariotas comprenden en general elementos de inicio de la transcripción y ya sea

elementos promotores-proximales, elementos potenciadores distantes o ambos.

El término "recombinante" utilizado con referencia, por ejemplo, a una célula o a un ácido nucleico, a una proteína o a un vector, indica que dicha célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico o una proteína heteróloga o indica una alteración del ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula deriva de una célula modificada de esa manera. Por consiguiente, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de lo contrario se expresan anormalmente, se subexpresan o no se expresan.

Un "potenciador" se refiere a una región reguladora de ADN que aumenta la transcripción. Un potenciador habitualmente se localiza fuera de la región promotora proximal, aunque no siempre es así, y se puede ubicar a varios kilobases o más del sitio de inicio de la transcripción, aún en posición 3' con respecto a la secuencia de codificación o dentro de los intrones del gen. Los promotores y potenciadores pueden conferir, ya sea solo o en combinación, una expresión específica de tejidos.

El término "silenciadora" se refiere a una región de control de ADN que, cuando está presente en el contexto

natural del gen de corina suprime la transcripción con dicho promotor, ya sea por sus propias acciones como un segmento de ADN discreto o a través de las acciones de factores que actúan en trans que se unen a dichos elementos y ejercen un control negativo de la expresión del gen. Este elemento puede cumplir un rol en el patrón de tipo restringido de expresión celular para el gen de corina, por ejemplo la expresión puede ser permisiva en los cardiomiocitos donde dicho silenciador puede estar inactivo, pero estar restringida en otros tipos celulares en los cuales dicho silenciador es activo. Este elemento puede, o no, funcionar aisladamente o en una construcción promotora heteróloga.

El término "aislado" con referencia, por ejemplo, a un polinucleótido significa que el material es eliminado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se trata de un polinucleótido natural), y aislado o separado de al menos un componente adicional con el cual está asociado naturalmente. Por ejemplo, un polinucleótido natural presente en su huésped vivo natural no está aislado, pero el mismo polinucleótido, separado de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían formar parte de una composición, y aún estar aislados por cuanto dicha composición no forma parte de su entorno natural.

El "porcentaje de identidad", o identidad porcentual, con referencia a una secuencia, significa que dicha secuencia se compara con un elemento reivindicado o una secuencia descrita después de alinear dicha secuencia a comparar con la secuencia descrita o reivindicada. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad y de similitud entre dos secuencias se pueden llevar a cabo usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferido de dicho algoritmo matemático se describe en Karlin et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) descritos en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.

Una "gran severidad", tal como se utiliza aquí, significa, por ejemplo, incubar un transferido durante la noche (por ejemplo, al menos 12 horas) con una sonda de polinucleótidos larga en una solución de hibridación que contiene, por ejemplo, SSC 5X, SDS 0,5%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y formamida 50%, a 42 °C. Los transferidos se pueden lavar bajo condiciones de gran severidad que permiten, por ejemplo, una falta de coincidencia de bp menor que un 5% (por ejemplo, dos lavados en SSC 0,1X y SDS 0,1% durante 30 min a 65 °C), seleccionando así las secuencias que poseen, por ejemplo, un 95% o más de identidad de secuencia.

Un polinucleótido se "expresa" cuando una copia de ADN del polinucleótido es transcrita en ARN.

Un polinucleótido está "ligado operativamente" a una región de control de la expresión de corina cuando la conjunción del polinucleótido y la región de control de la expresión de corina en una sola molécula da como resultado la transcripción del polinucleótido, más preferentemente en una transcripción específica del corazón (en los miocitos).

Un "polinucleótido heterólogo" se refiere a polinucleótidos, distintos de los de la región de control de la expresión de corina, que están ligados operativamente a una región de control de la expresión de corina y que se expresan preferencialmente en células específicas del corazón. El polinucleótido ligado codifica una molécula de utilidad terapéutica, por ejemplo un polipéptido, un ARN antisentido. Los términos "aislado", "purificado" o "biólogicamente puro" se refieren a un material que está sustancialmente o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica, tal como electroforesis sobre gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta presión. Una proteína que es la especie predominante en una preparación está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado es separado de los marcos de lectura

abiertos que flanquean al gen y codifican otras proteínas. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o una proteína dará lugar esencialmente a una banda en un gel de electroforesis. En particular, significa que el ácido nucleico o la proteína es al menos un 85% puro, más preferentemente al menos un 95% puro y con mayor preferencia al menos un 99% puro.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en la presente para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos comprenden un mimético químico artificial del correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales comprenden los aminoácidos que están codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que son modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que presentan la misma estructura química básica que el aminoácido natural, es

decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos contienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o esqueletos de péptidos modificados, pero que retienen la misma estructura química básica que los aminoácidos naturales. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que poseen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar al aminoácido natural.

En la presente se puede hacer referencia a los aminoácidos ya sea por sus símbolos conocidos de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura en Bioquímica de IUPAC-IUB. Asimismo, se puede hacer referencia a los nucleótidos por su código de una sola letra comúnmente aceptado.

El término "variantes modificadas conservadoramente" se aplica a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes modificadas conservadoramente se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración

del código genético, hay una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos que codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos al aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición donde una alanina es especificada por un codón, dicho codón puede ser alterado en cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silentes", que comprenden una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Aquí, cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada variación silente posible del ácido nucleico. El especialista comprenderá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que comúnmente es el único codón para metionina, y TGG, que comúnmente es el único codón para triptofano) puede ser modificado para obtener una molécula funcionalmente idéntica. Por lo tanto, cada variación silente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está incluido implícitamente en cada secuencia descrita.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, el especialista comprenderá que es posible efectuar sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, de péptidos, polipéptidos o proteína que altera, añade o suprime un solo aminoácido o

228
228/8 36

bien, un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservadoramente", donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en el arte. Dichas variantes modificadas conservadoramente están incluidas y no excluyen las variantes polimórficas, los homólogos entre especies y los alelos de la invención.

Cada uno de los siguientes ocho grupos contiene aminoácidos que constituyen sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984).

Un "vector de expresión" se refiere a una construcción de ácido nucleico, generada por recombinación o síntesis, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados

226 227 229

que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede formar parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye el ácido nucleico que será transcrito ligado operativamente a una región de control de la expresión, por ejemplo la región de control de la expresión de corina.

Un "excipiente aceptable para uso farmacéutico" se refiere a un vehículo aceptable, y cualquier sustancia auxiliar aceptable para uso farmacéutico requerida para que sea compatible con las condiciones fisiológicas, que no son tóxicos y que no afectan adversamente la actividad biológica de la composición farmacéutica suspendida o incluida en la misma. Los excipientes adecuados serán compuestos tales como manitol, succinato, glicina o albúmina de suero.

Una "cantidad eficaz en términos terapéuticos" se refiere a una cantidad de un compuesto de la invención que, cuando es administrado a un sujeto que lo necesita, es suficiente para el tratamiento, definido más adelante, de pacientes que sufren de, o que pueden desarrollar, enfermedades cardíacas. La cantidad de un compuesto que constituye una "cantidad eficaz en términos terapéuticos" varía dependiendo del compuesto, pero puede ser determinada mediante procedimientos de rutina por el especialista en el arte teniendo en cuenta su conocimiento y esta descripción.

Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se utilizan aquí, abarcan el tratamiento de enfermedades cardíacas e incluyen:

(a) prevenir la aparición de una enfermedad cardíaca en un ser humano, en particular cuando dicho ser humano tiene una predisposición para sufrir de estas afecciones;

(b) inhibir la enfermedad cardíaca, es decir detener su desarrollo; o

(c) aliviar una enfermedad cardíaca, es decir causar un retroceso de las afecciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con la clonación e identificación de la región de control de la expresión de un gen de corina de mamífero (por ejemplo ratón, ser humano), incluyendo el promotor y otros elementos reguladores y el uso de esta región de control de la expresión para identificar agentes que modulan la expresión del gen de corina y su uso en el tratamiento de enfermedades cardíacas. En particular, la invención se relaciona con polinucleótidos que comprenden una nueva región de control de la expresión de la corina humana y la capacidad de esta región de control para dirigir la expresión específica del corazón de polinucleótidos heterólogos ligados operativamente a la misma.

Aislamiento y caracterización de polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina

Esta invención se basa en técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley y Sons, Nueva York, NY, 1994).

Organización del gen de corina de mamífero

En la figura 1 se muestra la organización de los genes de corina humanos y de murinos y la ubicaciones de clones BAC (cromosoma artificial bacteriano), contig y un clon de plásmido que contiene a los genes de corina y sus regiones flanqueadoras 5'. Ambos genes de corina, humano y de murino, abarcan al menos 200 Kb y consisten de 22 exones y 21 intrones.

La secuencia de ADNc de corina predice una proteína compuesta de numerosos dominios discretos. Los límites entre los dominios de la proteína corresponden casi exactamente a los límites de exones/intrones de la estructura genómica, como se ilustra esquemáticamente en la figura 2. La cola citoplasmática por el extremo N-terminal está codificada por el exón 1 y la mitad del exón 2, seguido del dominio

transmembrana que está codificado por la otra mitad del exón 2. La región entre el dominio transmembrana y el primer dominio *frizzled* está codificada por el exón 3. Cada uno de los dominios *frizzled* está codificado por dos exones, cada uno de los ocho LDLR por un solo exón y el dominio rico en cisteína del receptor del secuestrante por tres exones. El dominio de proteasa por el extremo C-terminal está codificado por los exones 19 a 22, donde el exón 19 codifica la secuencia que incluye el sitio de activación proteolítica y el residuo histidina catalítico. Los exones 20 y 22 codifican las secuencias que incluyen los otros dos residuos catalítico, ácido aspártico y serina, respectivamente.

Clonación de la región de control de la expresión de corina

Para clonar los genes de corina humano y de murino y sus regiones flanqueadoras 5', se sintetizaron oligonucleótidos específicos correspondientes a las secuencias de ADNc de corina publicados para estos genes (Yan et. al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 14926-14935). Estos cebadores de oligonucleótidos fueron evaluados amplificando productos específicos en reacciones basados en PCR usando ADN genómico humano o murino. Los pares de cebadores que amplificaron exitosamente los productos específicos por la PCR se usaron luego en un examen basado en PCR para identificar clones BAC que contenían el gen de corina humano o murino y/o sus correspondientes regiones flanqueadoras 5'.

Los clones BAC positivos identificados fueron secuenciados directamente mediante una estrategia *shotgun* o subclonados en el pUC118 (PanVera/Takara, Madison, WI) para la secuenciación. El ensamblaje de las secuencias con *shotgun* se efectuó usando el paquete Staden (Bonfield et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 4992-4999).

Se obtuvieron cuatro clones BAC, dos contienen genes de corina humanos y dos contienen genes de corina de murinos, en un procedimiento basado en PCR. Se secuenciaron tres de los clones BAC usando una estrategia *shotgun* y estas secuencias, en combinación con la información en el archivo de seguimiento disponible en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Traces/trace.cgi>, <http://trace.ensembl.org>), que se usaron para ensamblar una secuencia contigua de 340 kb que contiene al gen de corina humano, y para determinar las secuencias de 5 contigs para el gen de corina de murinos. Para dicho gen de corina murino, se confirmó el orden de los 5 contigs por la existencia de varios pares de lectura apareados en los respectivos contigs vecinos. La distancia de los mismos permitió determinar que el tamaño del hueco o de la falta de coincidencia era menor que 500 bp, porque el tamaño del inserto de las bibliotecas *shotgun* disponibles al público estaba bien definido. Luego se analizaron las estructuras de los genes de corina humanos y de murinos. Sin embargo, la secuencia genómica humana de 340 kb no contenía

la región flanqueadora 5'. Se aisló un fragmento Hind III-EcoR I adicional de 4165 bp del BAC 26540, que incluía los primeros 3919 bp de la región flanqueadora 5', todos del exón 1 y parte del intrón 1 (enviado al banco de datos GenBank™/EBI con el número de acceso AF521006).

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina descritos en la presente derivaban todos del fragmento Hind III-EcoR I de 4165 bp (véase la figura 8, SEQ ID N°: 2) aislado del BAC26540. Estos polinucleótidos de la región de control de la expresión se obtuvieron con un método basado en PCR o con digestión con enzimas de restricción o una combinación de ambos. Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina de 4023 bp (SEQ ID N°: 6) se amplificaron a partir del fragmento Hind III-EcoR I de 4165 bp o del ADN genómico humano usando los cebadores F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (SEQ ID N°: 7) y R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (SEQ ID N°: 8). De manera similar, se amplificaron los polinucleótidos la región de control de la expresión de la corina de 1283 bp (SEQ ID N°: 5) usando los cebadores F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (SEQ ID N°: 9) y R1 y los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina de 391 bp (SEQ ID N°: 4) se amplificaron usando los cebadores F3 (5'-AAGCTTAGTAACTCTTTTGCTCCCAA-3') (SEQ ID N°: 10) y R1.

Cualquier tejido de mamífero, tal como leucocitos, de los cuales es posible extraer fácilmente el ADN, constituye una fuente adecuada de ADN genómico para el aislamiento de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina de mamífero.

Polinucleótidos funcionales de la región de control de la expresión de corina

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina descritos previamente fueron evaluados por su actividad de transcripción específica del corazón ligando operativamente los polinucleótidos de una región de control de la expresión dada a un gen informante, transfectando la construcción en miocitos cardíacos y evaluando luego la capacidad de la secuencia de polinucleótidos de dicha región de control de la expresión particular para dirigir una transcripción específica del corazón del gen informante. Los informantes de genes codifican típicamente proteínas que tienen una actividad enzimática fácilmente evaluable, que no está presente naturalmente en la célula huésped. Las proteínas informantes típicas para los promotores eucariotas incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciérnaga o luciferasa de Renilla, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, fosfatasa alcalina y proteína fluorescente

verde (GFP). El gen informante preferido es la luciferasa de luciérnaga.

El sistema para evaluar la actividad de la región de control de la expresión de corina puede ser una transfección transitoria o estable en líneas celulares cultivadas. Los vectores de ensayo que contienen los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina ligados operativamente a los genes informantes pueden ser transfectados en cualquier línea celular de mamífero para evaluar la actividad del promotor; por información sobre los métodos de cultivo celular, transfección y evaluación de genes informantes véase Ausubel et al. (2000), *supra*; *Transfection Guide*, Promega Corporation, Madison, WI (1998). Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina pueden ser evaluados por su actividad de transcripción específica del corazón por transfección de los vectores de ensayo en paralelo en líneas celulares derivadas y no derivadas del corazón. Típicamente, un vector control que comprende un segundo gen informante dirigido por un promotor conocido, por ejemplo, la luciferasa de Renilla dirigida por el promotor temprano/potenciador SV40 (pRL-SV40, Promega, Madison, WI) es co-transfectado junto con dicho vector de ensayo para controlar las variaciones en cuanto a eficacia de transfección o traducción del gen informante entre las distintas líneas celulares.

Como alternativa, la transcripción dirigida por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina también puede ser detectada por medición directa de la cantidad de ARN transcrita de dicho gen informante. En estas realizaciones, el gen informante puede ser cualquier ácido nucleico que se pueda transcribir de secuencia conocida que no sea expresado de otra manera por la célula huésped. El ARN expresado a partir de las construcciones con los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina puede ser analizado mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, transcripción inversa y amplificación del ARNm, aislamiento de ARN total o ARN poli A⁺, transferencia Northern, transferencia puntual, hibridación *in situ*, protección con RNasa, extensión con cebadores, tecnología de ordenamiento de polinucleótidos de gran densidad y semejantes.

La capacidad de la secuencia de polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina para activar la transcripción se evalúa típicamente con relación a una construcción de control. En una realización, se evalúa la capacidad de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina para activar la transcripción por comparación de la expresión de un gen informante ligado a dichos polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina con la expresión de un gen informante

idéntico no ligado a dicha secuencia. Por consiguiente, en una realización preferida, se compara la expresión de luciferasa entre pRL-SV40 y pRL-SV40, donde la secuencia de polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina fue insertada 5' con respecto al gen de luciferasa (véase el Ejemplo 2, Figura 4). En otras realizaciones, se puede comparar la actividad de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina con la de un promotor conocido. Por consiguiente, se compara la actividad de un gen informante dirigido por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina con la actividad de un gen informante dirigido por un promotor ya caracterizado (por ejemplo, el promotor/potenciador SV40 en pGL3-Control, Promega, Madison, WI).

La especificidad del corazón de la transcripción dirigida por la región de control de la expresión de corina se puede evaluar comparando la transcripción de un gen informante en células que derivan y que no derivan de tejido cardíaco. Las líneas celulares derivadas del corazón adecuadas para evaluar la transcripción específica del corazón son AT-1 (Claycomb et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2979-2984), HL-1 (Lanson et al. (1992) *Circulation* 85: 1835-1841) y HL-5 (Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 16900-16905). Una línea celular preferida es la línea celular HL-5. Se puede emplear cualquier línea celular de

mamífero fácilmente transfectable para evaluar la actividad de la región de control de la expresión de corina en células no cardíacas (por ejemplo, células HeLa, ATCC N° CCL2). En el Ejemplo 3 (Fig. 5), se demuestra la actividad específica del corazón de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina tanto humanos (hCp405LUC) como de ratón (mCp642LUC) mediante comparación de la expresión de luciferasa de luciérnaga a partir de vectores con y sin estos fragmentos de la región de control de la expresión en líneas celulares HL-5 y HeLa. Para cada ensayo, se normaliza la actividad de la región de control de la expresión de la corina con la actividad del promotor SV40 co-transfectado (es decir, pGL3-Control) con el fin de controlar la variabilidad entre las líneas celulares.

Una vez demostrada la actividad de transcripción específica del corazón de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina, se pueden efectuar y evaluar supresiones, mutaciones, reordenamientos y otras modificaciones de secuencia por su transcripción específica del corazón en los ensayos de la invención. Dichos derivados de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina son de utilidad para generar promotores más compactos, para disminuir la expresión basal en células no cardíacas, para eliminar secuencias represoras o para identificar nuevas proteínas reguladoras de la transcripción

245 42
30
240

específicas del corazón. Se pueden comparar las secuencias de la región de control de la expresión de corina de seres humanos y roedores para identificar elementos reguladores de la transcripción conservados, incluyendo aquellos que confieren una expresión específica del corazón.

Se pueden construir subfragmentos y derivados de la región de control de la expresión de corina utilizando los métodos de ADN recombinante convencionales conocidos en el arte. Uno de dichos métodos consiste en generar una serie de derivados de supresión dentro de la secuencia de la región de control de la expresión de corina (Ejemplo 2). La comparación de la actividad de transcripción de una serie de supresión, permite localizar los elementos que contribuyen o que disminuyen una transcripción específica del corazón. Sobre la base de dichos análisis, es posible diseñar derivados de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina. Por ejemplo, se pueden comparar elementos de la región de control de la expresión de corina con elementos reguladores específicos del corazón o ubicuos de promotores heterólogos para incrementar la especificidad cardíaca o la actividad de los polinucleótidos de la región de control de la expresión de la corina.

Vectores y células huésped

La presente invención también se relaciona con vectores que incluyen los polinucleótidos de la presente invención,

241/43
41
241

con células huésped que son manipuladas genéticamente con los vectores de la invención y con la producción de los polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. Dichas técnicas se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 y Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1989.

Las células huésped pueden ser manipuladas genéticamente para incorporar polinucleótidos que contienen a la región de control de la expresión de corina de la presente invención, así como los polinucleótidos que contienen la región de control de la expresión de corina ligados operativamente a los genes que codifican corina u otros polipéptidos, con el fin de permitir la expresión del producto codificado por los polinucleótidos ligados, por ejemplo corina. Los polinucleótidos pueden ser introducidos en células huésped usando técnicas bien conocidas de infección, transducción, transfección, transvección y transformación. Los polinucleótidos se pueden introducir solos o con otros polinucleótidos. Dichos otros polinucleótidos se pueden independientemente, se pueden co-introducir o se pueden introducir unidos a los polinucleótidos de la invención.

Por consiguiente, por ejemplo, los polinucleótidos de

la invención pueden ser transfectados en células huésped junto con otro polinucleótido separado que codifica un marcador seleccionable, usando técnicas estándar de co-transfección y selección, por ejemplo, en células de mamífero. En este caso, los polinucleótidos se incorporarán en general de forma estable en el genoma de la célula huésped.

Como alternativa, los polinucleótidos se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para su propagación en un huésped. La construcción del vector se puede introducir en las células huésped utilizando las técnicas ya mencionadas. En general, se introduce un vector de plásmido como ADN en la forma de un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. También se puede usar electroporación para introducir polinucleótidos en un huésped. Si el vector es un virus, puede ser empaquetado *in vitro* o se puede introducir en una célula empaquetadora y el virus empaquetado puede ser transducido en las células. Hay una amplia variedad de técnicas adecuadas para obtener polinucleótidos y para introducir polinucleótidos en células de acuerdo con este aspecto de la invención que son bien conocidas y de rutina para los especialistas en el arte. Dichas técnicas se revisan extensamente en Sambrook et al., citado previamente, que son ilustrativas de los numerosos manuales de

laboratorio que describen detalladamente estas técnicas. De acuerdo con este aspecto de la invención, el vector puede ser, por ejemplo, un vector plásmido, un vector de fago de cadena simple o doble, un vector viral de ARN o ADN de cadena simple o doble. Dichos vectores se pueden introducir en las células como polinucleótidos, preferentemente ADN, mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en células. Los vectores, en el caso de vectores de fagos y virales, también y preferentemente se pueden introducir en las células como virus empaquetados o encapsulados mediante técnicas bien conocidas de infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes para la replicación o defectuosos para la replicación. En este último caso, la propagación viral generalmente tendrá lugar solamente en células huésped complementarias.

Los vectores preferidos, en determinados sentidos, son los que permiten la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención. En general, dichos vectores comprenden regiones de control que actúan en cis eficaces para la expresión en un huésped ligados operativamente al polinucleótido a expresar. Los factores apropiados que actúan en trans son suministrados por el huésped, son suministrados por un vector complementario o son suministrados por el propio vector con la introducción en el huésped.

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la invención se pueden insertar en el vector mediante cualquiera de las numerosas técnicas bien conocidas y de rutina. En general, la secuencia de ADN a expresar se une a un vector de expresión clivando la secuencia de ADN y el vector de expresión con una o más endonucleasas de restricción y posterior unión de los fragmentos de restricción usando la T4 ADN ligasa. Los procedimientos de restricción y ligación que se pueden usar para tal fin son bien conocidos y de rutina para los especialistas. Los procedimientos adecuados en este sentido, y para construir vectores de expresión usando técnicas alternativas, que también son bien conocidos y de rutina para los especialistas, se describen con gran detalle Sambrook et al., citado precedentemente.

Usos de la región de control de la expresión de corina

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención son de utilidad para expresar específicamente moléculas terapéuticas en células derivadas del corazón. La expresión específica del corazón de las moléculas terapéuticas se puede utilizar, por ejemplo, para tratar insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión e hipertrofia cardíaca. Por lo tanto, se pueden construir vectores que comprenden polinucleótidos terapéuticos ligados operativamente a los polinucleótidos de

la región de control de la expresión de corina de la presente invención y administrarlos a los pacientes para el tratamiento de enfermedades cardíacas y para desarrollar sustancias terapéuticas nuevas y mejoradas.

Se puede ligar operativamente cualquier polinucleótido terapéutico a los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina, incluyendo a modo de ejemplo, el polinucleótido que codifica corina. Típicamente, dichos polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina se incluyen en un casete de expresión y se inserta 5' con respecto al polinucleótido terapéutico a expresar. Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina se pueden ubicar inmediatamente proximales para el polinucleótido terapéutico, aunque los elementos potenciadores del polinucleótido de la región de control de la expresión de corina se puede ubicar en cualquier lado comprendido dentro de varios kilobases con respecto al polinucleótido terapéutico, incluyendo el extremo 3' del polinucleótido terapéutico y dentro de los intrones. La capacidad del polinucleótido de la región de control de la expresión de corina para conferir una transcripción específica del corazón a partir de una posición dada puede ser verificada ubicando al polinucleótido de la región de control de la expresión de corina en una configuración apropiada con relación a un gen informante y analizando la

actividad específica del corazón del gen informante como se describe en la presente.

El polinucleótido de la región de control de la expresión de corina se puede ligar directamente al polinucleótido que codifica una molécula terapéutica sin secuencias adicionales. En las realizaciones donde el polinucleótido de la región de control de la expresión de corina no incluye los elementos de inicio de la transcripción de corina, se deben suministrar elementos adicionales, tal como una caja TATA y sitios de inicio de la transcripción. Estos pueden ser los elementos de inicio de la transcripción nativos del gen terapéutico o pueden derivar de un promotor heterólogo eucariota o viral. Además, es posible incrementar el nivel de expresión del gen terapéutico incluyendo secuencias potenciadoras y de poliadenilación del gen terapéutico o de genes heterólogos, en tanto se conserve la especificidad de la expresión para el corazón (medida en los ensayos de la invención).

Los vectores para transfectar células derivadas del corazón *in vitro* e *in vivo*, los métodos para asegurar una expresión sostenida en células derivadas del corazón *in vivo*, los métodos para ligar operativamente los polinucleótidos terapéuticos a promotores específicos del corazón y los métodos para dirigir a los vectores hacia las células cardíacas *in vitro* o *in vivo*, las rutas de

administración y las dosificaciones para el tratamiento de enfermedades cardíacas con vectores terapéuticos se pueden consultar en Tang et al. (2002) *Methods* 28: 259-266; Phillips et al. (2002) *Hypertension* 39: 651-655; Prentice et al. (1997) *Cardiovas. Res.* 35: 567-574; Beggah AT et al. (2002) *PNAS* 99: 7160-7165; Monte et al. (2003) *J. Physiol.* 546: 49-61.

Por lo tanto, los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se pueden utilizar para una expresión específica del corazón de diversos polinucleótidos terapéuticos. Los polinucleótidos terapéuticos expresados por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina son activos por sí mismos (por ejemplo, polinucleótidos antisentido y catalíticos) o pueden codificar una proteína que tendrá beneficios terapéuticos.

Expresión de ribonucleótidos antisentido y catalíticos.

Uno de los tipos de polinucleótidos terapéuticos que puede ser expresado por los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina es ARN antisentido o ARNi (Fire, A. (1999) *Trends. Genet.* 15: 358-363; Sharp, P. (2001) *Genes Dev.* 15: 485-490). En dichas realizaciones, el polinucleótido de la región de control de la expresión de corina está ligado operativamente a un polinucleótido que, cuando es transcrito por las ARN polimerasas celulares,

tiene la capacidad de unirse a un ARNm blanco. La derivación de una secuencia antisentido, basada en una secuencia de ADNc que codifica una proteína blanco se describe, por ejemplo, en Stein & Cohen (1988) *Cancer Res.* 48: 2659-68 y van der Krol et al. (1988) *BioTechniques* 6: 958-76. La proteína blanco serán generalmente una proteína cuya presencia podría contribuir o incrementar las probabilidades de enfermedades cardíacas, por ejemplo la enzima convertidora de angiotensina, el receptor de angiotensina II o NF-ATC (Stein et al. (1998) *Amer. Heart J.* 135: 914-923; Levin et al. (1998) *New Eng. J. Med.* 339: 321-328; Keating y Goa (2003) *Drugs* 63: 47-70). Por consiguiente, la expresión específica del corazón de la molécula antisentido puede reducir preferencialmente la expresión de estas proteínas en los individuos de riesgo. Se ha descrito el uso exitoso de una expresión antisentido específica del corazón (Beggah AT et al. (2002) *PNAS* 99: 7160-7165). Dicho enfoque ha demostrado su eficacia en el tratamiento de fibrosis cardíaca e insuficiencia cardíaca usando una expresión específica del corazón (Lee et al. (1966) *Anticancer Res.* 16: 1805-11).

Además de los polinucleótidos antisentido, se pueden diseñar ribozimas para inhibir la expresión de moléculas blanco. Una ribozima es una molécula de ARN que cliva catalíticamente otras moléculas de ARN. Por lo tanto, los

polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se pueden usar para expresar ribozimas específicamente en células derivadas del corazón ligando un polinucleótido que codifica una ribozima a un polinucleótido de la región de control de la expresión de corina. Se han descrito diferentes tipos de ribozimas, incluyendo ribozimas del grupo I, ribozimas de cabeza de martillo, ribozimas en horquilla, RNasa P y ribozimas de cabeza de hacha (véase, por ejemplo, Castanotto et al. (1994) *Adv. in Pharmacology* 25: 289-317 por una revisión general de las propiedades de las diferentes ribozimas). Las características generales de las ribozimas en horquilla se describen, por ejemplo, en Hampel et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 299-304; Hampel et al., Publicación de Patente Europea N°: 0 360 257 (1990); Patente de EE.UU. N°: 5.254.678. Los métodos para preparar ribozimas son bien conocidos por los especialistas en el arte (véase, por ejemplo, Wong-Staal et al., WO 94/26877; Ojwang et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6340-44; Yamada et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 1: 39-45; Leavitt et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92: 699-703; Leavitt et al. (1994) *Hum. Gene Ther.* 5: 1115-20; y Yamada et al. (1994) *Virology* 205: 121-26).

Expresión de proteínas terapéuticas:

250
50

Se puede utilizar una amplia variedad de proteínas terapéuticas en el tratamiento de enfermedades cardíacas. Por lo tanto, el polinucleótido de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se puede usar para expresar polinucleótidos que codifican proteínas terapéuticas específicamente en células cardíacas. Las proteínas terapéuticas pueden ser de origen procariota, eucariota, viral o sintético. Cuando la proteína terapéutica no es originaria de mamíferos, la secuencia de codificación de la proteína puede ser modificada para maximizar la expresión en mamíferos de acuerdo con métodos conocidos en el arte (por ejemplo, utilización de codones de mamífero y sitios consenso de inicio de la traducción).

Las proteínas terapéuticas se pueden ligar operativamente a los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina para permitir una expresión específica en el corazón y emplear con éxito en el tratamiento de enfermedades cardíacas de cualquier etiología, incluyendo (a modo de ejemplo) enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad cardíaca hipertensiva, enfermedad cardíaca valvular, miocarditis, cardiomiopatía de Chagas y cardiomiopatía idiopática. Dichas proteínas terapéuticas incluyen, a modo de ejemplo, proteínas tales como la corina, que convierte al pro-péptido natriurético atrial (pro-ANP) en ANP, ANP, que disminuye el volumen y la

251
~~52~~ 53

presión sanguínea promoviendo la secreción de sodio y la vasodilatación, y el péptido natriurético de tipo B, (Stein et al. (1998) *Amer. Heart J.* 135: 914-923; Levin et al. (1998) *New Eng. J. Med.* 339: 321-328; Keating y Goa (2003) *Drugs* 63: 47-70), así como formas dominantes negativas de dichos genes, como corina (Wu et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 16900-16905).

Identificación de moduladores de la expresión de corina

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención se pueden utilizar para identificar nuevos moduladores que serán de utilidad en el control de enfermedades relacionadas con el corazón en mamíferos, en especial en el hombre, ejemplos de los cuales son: hipertensión cardiovascular, insuficiencia cardíaca congestiva o cardiomiopatías. Dichos moduladores son de utilidad en el tratamiento de un huésped con niveles anormales de expresión del gen de corina. Los moduladores del gen de corina también se pueden usar para tratar enfermedades y afecciones que son modificadas por el nivel de expresión del gen de corina, tal como, a modo de ejemplo, elasticidad mecánica, volumen sanguíneo, excreción de sales, producción urinaria y tono vasomotor. Los moduladores también son de utilidad para imitar en animales aquellas enfermedades o afecciones del hombre que se relacionan con el nivel de expresión de los polipéptidos seleccionados.

Específicamente, los agentes que se unen y modulan dicha expresión se pueden identificar por su capacidad para causar un cambio en el nivel de transcripción de un gen informante, por ejemplo de luciferasa, que ha sido ligado operativamente a un polinucleótido de la región de control de la expresión de corina, descrito precedentemente. (Véase el Ejemplo 2).

Los agentes evaluados en el método anterior se pueden seleccionar aleatoriamente o racionalmente o pueden ser diseñados. Tal como se utiliza aquí, se dice que un agente es seleccionado aleatoriamente cuando dicho agente se elige al azar sin tener en cuenta ninguna secuencia específica. Un ejemplo de agentes seleccionados aleatoriamente es el uso de una biblioteca química o un caldo de cultivo de un organismo o extracto de plantas (Bunin, et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10997-10998 y las referencias citadas en la misma).

Tal como se utiliza aquí, se dice que un agente es seleccionado racionalmente o diseñado cuando dicho agente se elige sobre una base no aleatoria que tiene en cuenta la secuencia del sitio de interés y/o su conformación con relación a la acción del agente.

Terapia genética

La presente invención provee polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina que pueden ser

transfectados en las células con fines terapéuticos *in vitro* e *in vivo*. Estos ácidos nucleicos se pueden insertar en cualquiera de numerosos vectores bien conocidos para la transfección de células y organismos blanco como se describirá más adelante. Los ácidos nucleicos son transfectados en células, *ex vivo* o *in vivo*, a través de la interacción del vector y la célula blanco. Típicamente, el ligamiento operativo de un polinucleótido de la región de control de la expresión de corina y un segundo polinucleótido, de utilidad terapéutica, genera una expresión específica del corazón de dicho segundo polinucleótido. Las composiciones son administradas a un paciente en una cantidad suficiente como para generar una respuesta terapéutica en dicho paciente. La cantidad adecuada para lograrlo se define como la "dosis o cantidad eficaz en términos terapéuticos".

Dichos procedimientos de terapia genética se han utilizado para corregir defectos genéticos, distintos tipos de cáncer e infecciones virales adquiridos y heredados en diversos contextos. La capacidad para expresar genes artificiales de utilidad terapéutica en humanos facilita la prevención y/o curación de muchas enfermedades importantes en el hombre, incluyendo muchas enfermedades que no se pueden tratar con otras terapias (por una revisión sobre procedimientos de terapia genética, véase Anderson (1992)

258 46
54
254

-5

Science 256: 808-13; Nabel & Felgner, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, págs. 211-17; Mitani & Caskey, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, págs. 162-66; Mulligan, *Science* (1993), Vol. 260, págs. 926-32; Dillon, *TIBTECH* (1993), Vol. 11, págs. 167-75; Miller, *Nature* (1992), Vol. 357, págs. 455-60; Van Brunt, *Biotechnology* (1998), Vol. 6, págs. 1149-54; Vigne, *Restorative Neurol. Neurosci.* (1995), Vol. 8, págs. 35-36; Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* (1995), Vol. 51, págs. 31-44; Haddada et al., en *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Doerfler & Böhm eds., 1995); y Yu et al., *Gene Therapy* (1994), Vol. 1, págs. 13-26).

La distribución del gen o del material genético en la célula es el primer paso en el tratamiento de enfermedades basado en una terapia genética. Hay numerosos métodos de distribución que son bien conocidos por los especialistas en el arte. Preferentemente, los ácidos nucleicos son administrados para su aplicación en terapias genéticas *in vivo* o *ex vivo*. Los sistemas de distribución de vectores no virales incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácidos nucleicos que forman complejos con un vehículo transportador, tal como un liposoma. Los sistemas de distribución de vectores virales incluyen virus a ADN y ARN, con genomas episómicos o integrados luego de su administración a la célula.

Los métodos de distribución no viral de ácidos nucleicos incluyen lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, policationes o lípidos: conjugados de ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales y captación de ADN mejorada por agentes. La lipofección se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N°: 5.049.386, 4.946.787; y 4.897.355, y los reactivos de lipofección se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, Transfectam™ y Lipofectin™). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para una lipofección eficaz con reconocimiento de receptores de polinucleótidos incluyen los de Felgner, WO 91/17424 y WO 91/16024. La distribución puede ser en células (administración ex vivo) o en tejidos blanco (administración in vivo).

La preparación de los complejos de lípido:ácido nucleico, incluyendo los liposomas dirigidos tal como complejos de inmunolípidos, es bien conocida para el especialista en el arte (véase, por ejemplo, Crystal, *Science* (1995), Vol. 270, págs. 404-10; Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* (1995), Vol. 2, págs. 291-97; Behr et al., *Bioconjugate Chem.* (1994), Vol. 5, págs. 382-89; Remy et al., *Bioconjugate Chem.* (1994), Vol. 5, págs. 647-54; Gao et al., *Gene Therapy* (1995), Vol. 2, págs. 710-22; Ahmad et al., *Cancer Res.* (1992), Vol. 52, págs. 4817-20; Patentes de

EE.UU. N°: 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028 y 4.946.787).

El uso de sistemas basados en ARN o ADN viral para la distribución de ácidos nucleicos aprovecha los procesos avanzados de dirigir un virus a células específicas en el cuerpo y transferir la carga viral al núcleo. Los vectores virales pueden ser administrados directamente a los pacientes (*in vivo*) o se pueden utilizar para el tratamiento de células *in vitro* y la posterior administración de las células modificadas a los pacientes (*ex vivo*). Los sistemas basados en virus convencionales para distribuir ácidos nucleicos pueden incluir los siguientes vectores: retrovirales, lentivirus, adenovirales, adenoasociados y *Herpes simplex* para la transferencia de genes. Los vectores virales constituyen actualmente el método más eficaz y versátil de transferencia de genes en células y tejidos de interés. La integración en el genoma huésped se puede lograr con los métodos de transferencia de genes con retrovirus, lentivirus y adenoasociados, que a menudo da como resultado una expresión a largo plazo del transgen insertado. Además, se han observado eficacias de transducción altas en muchos tipos celulares y tejidos blanco diferentes. En particular, actualmente existen al menos seis enfoques con vectores virales para la transferencia de genes en estudios clínicos, siendo por mucho los vectores retrovirales el sistema de uso

24
57
29
25X

más frecuente. Todos estos vectores virales utilizan enfoques que comprenden complementación de vectores defectuosos por genes insertados en líneas celulares auxiliares para generar el agente de transducción.

El tropismo de un retrovirus puede ser alterado con la incorporación de proteínas de envoltura extrañas, que expanden así la población blanco potencial de células blanco. Los vectores lentivirales son vectores retrovirales capaces de transducir o infectar células que no están en división y típicamente producen títulos virales altos. La selección del sistema de transferencia de genes retrovirales dependerá entonces del tejido blanco. Los vectores retrovirales están compuestos de repeticiones terminales largas que actúan en *cis* con capacidad para empaquetar hasta 6-10 kbp de secuencia extraña. Las LTR mínimas que actúan en *cis* son suficientes para la replicación y el empaquetamiento de vectores, que luego se utilizan para integrar el gen terapéutico en la célula blanco con el fin de proveer una expresión permanente del transgen. Los vectores retrovirales de mayor uso incluyen los que se basan en el virus de leucemia murino (MuLV), virus de leucemia de gibones (GaLV), virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y combinaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Buchscher et al., *J. Virol.* (1992), Vol. 66, págs. 2731-39; Johann et al., *J. Virol.* (1992),

58
58
250

Vol. 66, págs. 1635-40; Sommerfelt et al., *Virology* (1990), Vol. 176, págs. 58-59; Wilson et al., *J. Virol.* (1989), Vol. 63, págs. 2374-78; Miller et al., *J. Virol.* (1991), Vol. 65, págs. 2220-24; PCT/US94/05700).

Los vectores pLASN y MFG-S son ejemplos de vectores retrovirales que se han utilizado en estudios clínicos (Dunbar et al., *Blood* (1995), Vol. 85, págs. 3048-57; Kohn et al., *Nat. Med.* (1995), Vol. 1, págs. 1017-23; Malech et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1997), Vol. 94, págs. 12133-38). El vector PA317/pLASN fue el primer vector terapéutico utilizado en un estudio de terapia genética (Blaese et al., *Science* (1995), Vol. 270, págs. 475-80). Se han observado eficacias de transducción del 50% o más para los vectores empaquetados MFG-S (Ellem et al., *Immunol. Immunother.* (1997), Vol. 44, págs. 10-20; Dranoff et al., *Hum. Gene Ther.* (1997), Vol. 1, págs. 111-23).

En aquellas aplicaciones donde se prefiere una expresión transitoria del ácido nucleico, se emplean típicamente sistemas basados en adenovirus. Los vectores basados en adenovirus pueden ofrecer una eficacia de transducción muy alta en muchos tipos celulares y no requieren de división celular. Con dichos vectores se han obtenido títulos y niveles de expresión altos. Este vector se puede producir en grandes cantidades con un sistema relativamente simple. También se usan vectores de virus

28/4
-39
259

adenoasociados ("AAV") para transducir células con ácidos nucleicos de interés, por ejemplo, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos y en los procedimientos de terapia genética *in vivo* y *ex vivo* (véase, por ejemplo, West et al., *Virology* (1987), Vol. 160, págs. 38-47; Patente de EE.UU. N°: 4.797.368; WO 93/24641; Kotin, *Hum. Gene Ther.* (1994), Vol. 5, págs. 793-801; Muzyczka, *J. Clin. Invest.* (1994), Vol. 94, págs. 1351). La construcción de vectores de AAV recombinantes se describe en numerosas publicaciones, incluyendo la Patente de EE.UU. N°: 5.173.414; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* (1985), Vol. 5, págs. 3251-60; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* (1984), Vol. 4, págs. 2072-81; Hermonat & Muzyczka, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, (1984), Vol. 81, págs. 6466-70; y Samulski et al., *J. Virol.* (1989), Vol. 63, págs. 3822-28.

Los vectores recombinantes de virus adenoasociados (rAAV) constituyen un sistema de distribución de genes alternativo prometedor que se basa en el virus adenoasociado parvovirus de tipo 2 defectuoso y no patogénico. Todos los vectores derivan de un plásmido que solamente retiene las repeticiones terminales invertidas de AAV de 145 bp que flanquean al casete de expresión transgénico. Una transferencia eficaz de genes y una distribución estable del transgen debido a su integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema de

vectores (Wagner et al., *Lancet* (1998), Vol. 351, págs. 1702-03; Kearns et al., *Gene Ther.* (1996), Vol. 9, págs. 748-55).

Los vectores adenovirales recombinantes de replicación deficiente (Ad) se usan predominantemente en las terapias genéticas de expresión transitoria, porque se pueden producir con títulos muy altos y porque infectan rápidamente numerosos tipos celulares diferentes. La mayoría de los vectores de adenovirus son manipulados de modo tal que un transgen reemplaza a los genes Ad E1a, E1b y E3; a continuación, el vector de replicación defectuosa es propagado en células 293 humanas que suministran la función suprimida del gene en *trans*. Los vectores Ad pueden transducir múltiples tipos de tejidos *in vivo*, incluyendo células diferenciadas, que no están en división, tal como los que se pueden encontrar los tejidos de hígado, riñón y el sistema muscular. Los vectores Ad convencionales tienen una gran capacidad portadora. Un ejemplo del uso de un vector Ad en un estudio clínico comprendía una terapia con polinucleótidos para la inmunización antitumoral con inyecciones intramusculares (Sternan et al., *Hum. Gene Ther.* (1998), Vol. 9, págs.1083-92). Otros ejemplos del uso de vectores de adenovirus para la transferencia de genes en estudios clínicos incluyen Rosenecker et al., *Infection* (1996), Vol. 241, págs. 5-10; Welsh et al., *Hum. Gene Ther.*

(1995), Vol. 2, págs. 205-18; Alvarez et al., *Hum. Gene Ther.* (1997), Vol. 5, págs. 597-613; Topf et al., *Gene Ther.* (1998), Vol. 5, págs. 507-13; Sterman et al., *Hum. Gene Ther.* (1998), Vol. 9, págs. 1083-89.

En muchas aplicaciones de terapia genética, resulta deseable que el vector de dicha terapia genética sea distribuido con un alto grado de especificidad en un tipo de tejido particular. El viral vector es modificado típicamente para presentar especificidad por un tipo celular dado mediante expresión de un ligando como una proteína de fusión con una proteína de recubrimiento viral por la superficie externa del virus. Se elige un ligando con afinidad por un receptor de presencia conocida en el tipo celular de interés. Por ejemplo, Han et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1995), Vol. 92, págs. 9747-51, informaron que el virus de leucemia murino Moloney puede ser modificado para expresar la heregulina humana fusionada a gp70, y el virus recombinante infecta determinadas células de cáncer de mama humanas que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Este principio se hace extensivo a otros pares de virus que expresan una proteína de fusión del ligando y el receptor expresado en la célula blanco. Por ejemplo, se pueden manipular fagos filamentosos para que expresen fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab o Fv) con una afinidad de unión específica para prácticamente

262
62
262

cualquier receptor celular de elección. Aunque la descripción anterior se aplica primariamente a vectores virales, se pueden aplicar los mismos principios a vectores no virales. Dichos vectores pueden ser manipulados para contener secuencias de captación específicas considerados favorables para su captación por células blanco específicas.

Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que pueden comprender la región de control de la expresión de corina o un vector que comprende la región de control de la expresión, en combinación con un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En una realización de la presente invención, el vehículo aceptable para uso farmacéutico es farmacéuticamente inerte.

Los vectores de terapia genética se pueden distribuir *in vivo* mediante administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica o infusión intracraneal) o por aplicación tópica, como se describirá más adelante. Como alternativa, los vectores pueden ser administrados a las células *ex vivo*, tal como a células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejidos) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido de reimplantación de las células en el paciente,

habitualmente después de seleccionar las células que han incorporado el vector.

La transfección de células *ex vivo* con fines de diagnóstico, investigación o para una terapia genética (por ejemplo, a través de una re-infusión de las células transfectadas en el organismo huésped) es bien conocida por los especialistas en el arte. En una realización preferida, se aíslan células del organismo, se transfectan con un ácido nucleico (gen o ADNc) y se vuelve a infundir en el organismo (por ejemplo, un paciente). Existen diversos tipos celulares adecuados para la transfección *ex vivo* que son bien conocidos por los especialistas en el arte (véase, por ejemplo, Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3ª ed., 1994)) y las referencias citadas en la misma por una discusión sobre cómo aislar y cultivar células de pacientes).

Los vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos terapéuticos también pueden ser administrados directamente al organismo para la transducción de células *in vivo*. Como alternativa, se puede administrar ADN desnudo. La administración se puede efectuar por cualquiera de las rutas usadas normalmente para introducir una molécula en contacto íntimo con células de tejidos o sangre. Los métodos de administración adecuados de dichos ácidos nucleicos se encuentran disponibles y son bien

conocidos por los especialistas en el arte y, aunque se puede emplear más de una ruta para administrar una composición particular, una determinada ruta a menudo puede ofrecer una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta.

Los vehículos aceptables para uso farmacéutico se determinan en parte por la composición particular que será administrada (por ejemplo, ácido nucleico, proteína, compuestos moduladores o células transducidas), así como por el método particular usado para administrar la composición. Por lo tanto, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas para la presente invención (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17^a ed., 1989). La administración se puede efectuar de cualquier manera conveniente, por ejemplo, por inyección, administración oral, inhalación o aplicación transdérmica.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir de: (a) soluciones líquidas, tal como una cantidad eficaz del ácido nucleico empaquetado suspendido en diluyentes, tal como agua, salina o PEG 400; (b) cápsulas, sachets o tabletas, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas

en tableta pueden incluir uno o más entre lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de papa, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de sílice coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, rellenos, aglutinantes, diluyentes, agentes amortiguadores del pH, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes, colorantes, agentes desintegradores y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas en grageas pueden comprender al ingrediente activo en un saborizante, por ejemplo, sacarosa, así como en pastillas que comprenden al ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de acacia, geles y semejantes, que contienen, además del ingrediente activo, los vehículos conocidos en el arte.

El compuesto de elección, ya sea solo o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden conformar en formulaciones de aerosol (es decir, pueden ser "nebulizados") con el fin de ser administrados por inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden colocar en un propelente presurizado aceptable, tal como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y semejantes.

Las formulaciones adecuadas para una administración parenteral, tal como, por ejemplo, por las rutas intraarticular (en las articulaciones), intravenosa,

intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones para inyección acuosas y no acuosas, estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, soluciones amortiguadoras, bacteriostatos y solutos que vuelven a la formulación isotónica con respecto a la sangre del receptor pretendido, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de esta invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. La administración parenteral e intravenosa son los métodos preferidos de administración. Las formulaciones de las composiciones se pueden presentar en contenedores sellados con dosis unitarias o dosis múltiples, tal como ampollas y viales.

Las soluciones y suspensiones para inyección se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo descrito previamente. Las células transducidas con los ácidos nucleicos para una terapia ex vivo también se pueden administrar por vía intravenosa o parenteral según se describió previamente.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, deberá ser suficiente como para obtener una respuesta terapéutica beneficiosa en dicho

paciente en el tiempo. La dosis será determinada según la eficacia del vector particular empleado y la afección del paciente, así como el peso corporal o área de superficie del paciente a tratar. El tamaño de la dosis también se determinará según la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar la administración de un vector particular o el tipo celular transducido en un paciente particular.

Para determinar la cantidad eficaz de vector que será administrada, el especialista evaluará los niveles plasmáticos en circulación del vector, la toxicidad del vector, el progreso de la enfermedad y la producción de anticuerpos anti-vector. En general, la dosis equivalente de ácido nucleico desnudo de un vector comprende entre aproximadamente 1 μg y 100 μg para un paciente típico de 70 kilogramos, y las dosis de vectores que incluyen una partícula retroviral se calculan para obtener una cantidad equivalente de ácido nucleico terapéutico.

Para la administración, los compuestos y las células transducidas de la presente invención pueden administrarse a una dosis determinada por el valor de LD-50 del inhibidor, vector o tipo celular transducido, y los efectos secundarios del inhibidor, vector o tipo celular a diversas concentraciones, aplicado a la masa y estado general de

salud del paciente. La administración se puede llevar a cabo con dosis simples o divididas.

Conjuntos de elementos

La presente invención se relaciona además con envases y conjuntos de elementos farmacéuticos que comprenden uno o más contenedores rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones mencionadas de la invención. Con dichos contenedores se puede asociar una nota en la forma de una prescripción de una entidad reguladora de la elaboración, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, reflejando la aprobación por parte de dicha entidad de la elaboración, el uso o la venta del producto para su administración a seres humanos.

Ratones transgénicos

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina de la presente invención también se pueden usar para producir un mamífero transgénico, preferentemente un ratón. Dicho organismo transgénico es de utilidad, por ejemplo, para identificar y/o caracterizar agentes que modulan la expresión y/o actividad de dicho polinucleótido. Los animales transgénicos también son de utilidad como modelos de estados de enfermedad cardíaca.

La invención descrita en la presente también se relaciona con un animal transgénico no humano que comprende en su genoma una o más copias de los polinucleótidos de la

invención. Los animales transgénicos de la invención pueden contener en sus genomas múltiples copias de los polinucleótidos.

En una realización preferida, el animal transgénico comprende en su genoma una región de control de la expresión del gen de corina humano. La invención abarca una amplia variedad de organismos transgénicos no humanos, incluyendo por ejemplo, *Drosophila*, *C. elegans*, pez cebra y levadura. El animal transgénico de la invención es preferentemente un mamífero, por ejemplo, una vaca, cabra, oveja, conejo, primate no humano o rata, más preferentemente un ratón.

Los métodos para producir animales transgénicos son bien conocidos por los especialistas en el arte e incluyen, por ejemplo, recombinación de homólogos, mutagénesis (por ejemplo, ENU, Rathkolb et al. (2000) *Exp. Physiol.*, 85: 635-644), y el sistema de expresión de genes regulado por tetraciclina (por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N°: 6.242.667), y no se describirán con detalle en la presente. (Véase, por ejemplo, Wu et al, *Methods in Gene Biotechnology*, CRC 1997, págs. 339-366; Jacenko, O., *Strategies in Generating Transgenic Animals*, en *Recombinant Gene Expression Protocols*, Vol. 62 de *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 1997, págs. 399-424).

La presente invención también se relaciona con un animal no humano noqueado cuyo genoma contiene una región de

control de la expresión del gen de corina humano que está ligado operativamente a una secuencia informante y donde dicha región de control es eficaz para iniciar, terminar o regular la transcripción de dicha secuencia informante.

La interrupción funcional de la secuencia informante ligada operativamente a la secuencia de control se pueden efectuar de cualquier manera eficaz, incluyendo, por ejemplo, introducción de un codón de terminación en cualquier parte de la secuencia de codificación de modo tal que el polipéptido resultante queda biológicamente inactivo (por ejemplo, porque carece de un dominio catalítico, un dominio de unión al ligando, etc.), introducción de una mutación en un promotor u otra secuencia reguladora que sea eficaz para desactivarlo o reducir la transcripción de la secuencia informante de una secuencia exógena en la secuencia informante que lo inactiva. Los ejemplos de animales transgénicos que contienen genes funcionalmente interrumpidos son bien conocidas, por ejemplo, los que se describen en las Patentes de EE.UU. N°: 6.239.326, 6.225.525, 6.207.878.

Sin entrar en detalles, se considera que el especialista en el arte puede, a la luz de las descripciones precedentes, utilizar la presente invención de forma acabada. Todos los ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas en el arte,

excepto cuando se describe de otra forma con mayor detalle. Las técnicas de biología molecular de rutina de los siguientes ejemplos se pueden realizar como se describe en los manuales de laboratorio estándar, tal como Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Las siguientes realizaciones específicas preferidas se deben considerar entonces como meramente ilustrativas, y no en un sentido limitativo del resto de la descripción en modo alguno. El contenido completo de todas las solicitudes, patentes y publicaciones citadas previamente se incorporan en este documento a modo de referencia.

Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de los genes de corina humano y de ratón que incluyen las regiones flanqueadoras 5'

Para clonar los genes de corina humanos y de murinos y sus regiones flanqueadoras 5', se sintetizaron oligonucleótidos específicos correspondientes a los extremos 5' y 3' de las secuencias de ADNc de corina. Estos cebadores de oligonucleótidos fueron evaluados amplificando productos específicos en reacciones basadas en PCR usando ADN genómico humano o murino. Las reacciones de PCR se efectuaron usando el Sistema de Reactivos para PCR (Life Technologies Inc.) con 30 ciclos de amplificación (1 min de desnaturalización a

94 °C, 1 min de alineación a 50 °C y 1 min de extensión a 72 °C) y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los pares de cebadores que amplificaron exitosamente los productos específicos de la PCR se usaron luego en un análisis basado en PCR para identificar clones BAC que contenían al gen de corina humano o murino y/o sus regiones de control de la expresión. El aislamiento del ADN de los clones BAC se efectuó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Incyte Genomics, Palo Alto, CA). Los clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) que fueron identificados como positivos se confirmaron además mediante análisis Southern usando sondas de ADNc de corina humana y de murino marcadas con ³²P. Los clones BAC fueron secuenciados directamente con una estrategia *shotgun* o subclonados en el pUC118 (PanVera/Takara, Madison, WI) para su secuenciación. El ensamblaje de las secuencias del *shotgun* se efectuó usando el paquete de software Staden (MRC Laboratory of Molecular Biology; Bonfield et al. (1995) *Nucleic Acid Res.* 23: 4992-4999).

Se obtuvieron cuatro clones BAC, dos de los cuales contenían los genes de corina humano y dos los genes de murinos, con el estudio basado en PCR. Se secuenciaron tres clones BAC con una estrategia *shotgun* usando química de terminación con colorante. La combinación de los datos de *shotgun* con la información del archivo de seguimiento

disponible al público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/Traces/trace.cgi>, <http://trace.ensembl.org>), permitió ensamblar secuencias contiguas de 340 kb que contenían al gen de corina humano, y 5 contigs para el gen de corina de murinos. El orden de los 5 contigs fue confirmado por la existencia de varios pares de lectura apareados en los respectivos contigs vecinos. La distancia entre los mismo permitió determinar que el tamaño del hueco era menor que 500 bp, porque el tamaño del inserto de las bibliotecas públicas de *shotgun* estaba bien definido. Luego se analizaron las estructuras de los genes de corina humanos y de murinos. Sin embargo, la secuencia genómica humana de 340 kb no contenía la región flanqueadora 5'. Se aisló un fragmento *Hind* III-*Eco*R I adicional de 4165 bp del BAC 26540, que incluía los primeros 3919 bp de la región flanqueadora 5', todo el exón 1 y parte del intrón 1 (enviado al banco de datos GenBank™/EBI con el número de acceso AF521006).

Los polinucleótidos de la región de control de la expresión de corina (SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6) fueron derivados todos del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp (Figura 8; SEQ ID N°: 2) aislada del BAC26540, usando un método basado en PCR o digestión con enzimas de restricción o una combinación de ambos. Por ejemplo, el bp polinucleótido de la región de control de la expresión de

corina de 4023 bp (SEQ ID N°: 6) descrito en la presente se amplificó a partir del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp o de ADN genómico humano usando los cebadores F1 (5'-AAGCTTCATGAGGGCAGGAG-3') (SEQ ID N°: 7) y R1 (5'-GAGCTCGCTTATTCTTCTGTCCACTT-3') (SEQ ID N°: 8). El polinucleótido de la región de control de la expresión de corina de 1283 bp (SEQ ID N°: 5) descrito en la presente se amplificó a partir del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp o de ADN genómico humano usando los cebadores F2 (5'-AAGCTTATAAAAATAATAGCTTCTTC-3') (SEQ ID N°: 9) y R1. El polinucleótido de la región de control de la expresión de corina de 391 bp (SEQ ID N°: 4) descrito en la presente se amplificó a partir del fragmento *Hind* III-*Eco*R I de 4165 bp o de ADN genómico humano usando los cebadores F3 (5'-AAGCTTAGTAACTCTTTTGCTCCCAA-3') (SEQ ID N°: 10) y R1. Cualquier tejido de mamífero, tal como leucocitos, del cual se pueda extraer fácilmente el ADN constituye una fuente adecuada de ADN genómico para el aislamiento de los polinucleótidos de corina de mamífero.

Ejemplo 2: Actividad del promotor de las regiones flanqueadoras 5'

Se examinó la actividad del promotor de las regiones flanqueadoras 5' de los genes de corina preparando construcciones informantes en las cuales se habían ligado fragmentos truncados en serie de las secuencias

flanqueadoras 5' de los genes de corina humanos o de murinos a un gen de luciferasa sin promotor (véase la figura 4A).

Las construcciones informantes promotoras de corina humana, hCp1297LUC (región de control de la expresión de corina de 1283 bp (SEQ ID N°:) ligada al gen de luciferasa de luciérnaga) y hCp405LUC (bp región de control de la expresión de corina de 391 bp (SEQ ID N°:) ligada al gen de luciferasa de luciérnaga), fueron generadas en dos pasos: primero, una clonación basada en PCR de la región flanqueadora 5' del gen de corina humano desde -1297 o -405 a -15 (con relación al codón de inicio de la traducción ATG) usando cebadores que contienen sitios de restricción para *Sac* I y *Hind* III, respectivamente; y, segundo, la inserción de los respectivos productos de la PCR en los sitios *Sac* I y *Hind* III del vector básico pGL3 (Promega, Madison, WI).

De manera similar, también se obtuvieron las construcciones promotoras de corina de murinos, mCp1183LUC, mCp809LUC y mCp646LUC, con el enfoque de clonación basada en PCR descrito previamente. Los plásmidos para estas construcciones se prepararon usando el conjunto de elementos EndoFree Plasmid Maxi (Qiagen, Valencia, CA). La transfección de células HL-5 (Claycomb et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.* 95: 2979-2984) se efectuó usando un método basado en lipofectina de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Life Technologies). Brevemente,

se mezclaron 10 µg de ADN de cada una de las construcciones informantes de corina más 0,1 µg de pRL-SV40 (Promega, Madison, WI) con 20 µg de lipofectina en 1 ml de medio cérico reducido Opti-MEM I. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y luego se agregó a células HL-5 de ~70% de confluencia en una cavidad de placas de 6 cavidades. Después de incubar durante 6 hs, el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco Ex-Cell 320; y 30 hs después se cosecharon las células transfectadas y se evaluaron las actividades de luciferasa de luciérnaga y Renilla. Se llevó a cabo un ensayo doble de actividad luciferasa de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega). Brevemente, se prepararon extractos celulares lisando las células transfectadas con 250 µl de solución amortiguadora de lisis pasiva recién diluida (Promega). Los lisados se congelaron y descongelaron una vez antes de una centrifugación a 13.000 rpm durante 5 min para agrupar los desechos celulares. Los sobrenadantes fueron transferidos a un tubo nuevo y se evaluó una alícuota de 20 µl de los sobrenadantes utilizando un sistema de Ensayo Informante de Luciferasa Doble. La luminiscencia de las muestras fue monitoreada con un luminómetro para microplacas LB96 V (EG&G Berthold), que medía la producción de luz (unidades de luz relativas) por una duración de 10 seg. Cada uno de los extractos celulares fue evaluado por triplicado. Cada

experimento de transfección para cada construcción se efectuó por triplicado. La actividad de la luciferasa de *Luciérnaga* se normalizó con la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

Tal como se muestra en la figura 4B, las construcciones informantes de corina humana hCP1297LUC y hCP405LUC promovieron las actividades de luciferasa que eran significativamente mayores que los valores basales en células básicas pGL3 transfectadas. De manera similar, las construcciones de receptores de murinos mCp1183LUC, mCp809LUC y mCp646LUC promovieron significativamente las actividades luciferasa en comparación con las de las construcciones humanas. Estos datos sugieren que la secuencia en *cis* responsable de la mayor parte de la actividad del promotor se ubica entre los nucleótidos -405 a -15 o los nucleótidos -646 a -77 en los genes de corina humanos y de murinos, respectivamente.

Ejemplo 3: Demostración de la expresión específica del corazón

Para determinar si las construcciones eran mediadoras de la expresión específica del corazón, se transfectaron células HeLa (ATCC N° CCL2), que no expresan ARNm y proteína de corina, con las construcciones descritas previamente. A diferencia de sus grandes actividades en células HL-5, las construcciones hCp405LUC y mCp646LUC solamente presentaban

una actividad mínima del promotor en las células HeLa (Fig. 5). Como control, el pRL-SV40 transfectado simultáneamente promovió niveles más alto de la actividad luciferasa de Renilla en HeLa que en células HL-5, lo cual era indicativo que las células HeLa eran tan fácilmente transfectadas como las células HL-5 en estos experimentos. Estos resultados indican que las secuencias flanqueadoras 5' de los genes de corina de -405 a -15 de humanos o de -646 a -77 de los genes de corina de murinos contienen elementos que son suficientes para una expresión específica en cardiomiocitos cultivados.

Ejemplo 4: Elementos GATA proximales que se unen a GATA-4 necesarios para una función óptima de los promotores de corina.

Las regiones flanqueadoras 5' de los nucleótidos -405 a -15 en humanos o de los nucleótidos -646 a -77 en ratón fueron suficientes para promover niveles altos de expresión genética en cardiomiocitos cultivados pero no en células HeLa. Esto sugiere que estas regiones contienen los elementos reguladores responsables de la expresión específica de cardiomiocitos. La inspección de estas regiones reveló una secuencia consenso GATA conservada (denominadas secuencias GATA proximales).

Para determinar si las secuencias GATA proximales en verdad se unen a las proteínas GATA, se prepararon extractos nucleares a partir de células HL-5 en fase de crecimiento

273
75
279

exponencial como se describe en la literatura (Schreiber E. et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 6419) y se llevó a cabo un ensayo de cambio de movilidad electroforética competitiva (EMSA) usando una sonda de oligonucleótidos GATA consenso bien caracterizada (Redondo, J.M. et al. (1990) *Science* 247(4947), 1225-9) y sondas que abarcaban cada una de las secuencias GATA proximales (Figura 6A). Las sondas de oligonucleótidos de cadena doble que contienen dos secuencias GATA consenso o secuencias GATA mutadas (GATA por CTTA) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology. Se sintetizaron las secuencias de las sondas (véase la figura 6A) que contienen la GATA de corina humana o de murinos (SEQ ID N°: 11 y 13, respectivamente) o la GATA mutada de corina humana y de murinos (GATA por CTTA) (SEQ ID N°: 12 y 14, respectivamente) y se purificaron por HPLC. Las sondas de oligonucleótidos se marcaron por el extremo 5' con T4 polinucleótido quinasa (Life Technologies) usando [γ - 32 P]-ATP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech). Los ensayos de cambio de movilidad sobre gel se llevaron a cabo como se describió previamente (Pan, J. & McEver R.P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 22600-22608). Como era de esperar, la sonda consenso GATA marcada (SEQ ID N°: 15) formó un complejo de ADN-proteína específico de la secuencia cuando se incubaba con extractos nucleares de células HL-5 (Fig. 6B). Se impidió la formación de este complejo por adición de

un exceso de 100 veces de la sonda no marcada pero no de un elemento GAS no relacionado. La formación del complejo era dependiente de la secuencia GATA intacta, porque las mutaciones en la secuencia GATA impidieron la formación del complejo. Aún más, el complejo no se detectó en presencia de un exceso de 100 veces de la sonda no marcada que contenía las secuencias GATA proximales ya sea humanas o de murinos. Por el contrario, un exceso de 100 veces de las sondas no marcadas que contenían las secuencias GATA proximales mutantes (SEQ ID N°: 12 y 14) tenía un efecto mínimo sobre la formación del complejo. Estos datos indican que las secuencias GATA proximales de corina y la sonda consenso GATA se unen a una o más proteínas GATA comunes.

Para determinar cuáles eran la o las proteínas GATA comprometidas en el complejo, se realizó un EMSA con la sonda consenso GATA marcada en presencia de anticuerpos contra miembros de la familia GATA. Los anticuerpos contra GATA-1 de ratón (SC-1234x), GATA-3 (SC-268x), GATA-4 (SC-12237x) y GATA-6 (SC-7244x) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Tal como se muestra en la figura 6C, un anticuerpo contra GATA-4 inhibió marcadamente la formación del complejo, en tanto los anticuerpos contra GATA-1, -3 y -6 tenían poco efecto. Para demostrar directamente la unión de GATA-4 con la secuencia GATA proximal, se usó la sonda GATA proximal humana marcada en

ausencia o presencia del mismo anticuerpo contra GATA-4. Tal como se muestra en la figura 6D, el anticuerpo contra GATA-4 inhibió por completo la formación de un complejo ADN-proteína con una movilidad similar a la del complejo formado con la sonda consenso GATA. Estos datos indican que GATA-4 se unía a las secuencias GATA proximales, lo cual sugería que la unión de GATA-4 a las secuencias GATA proximales pueden contribuir en la expresión del gen de corina en miocitos de corazón.

A fin de corroborar si los elementos GATA proximales realmente son necesarios para la actividad del promotor, se mutó la secuencia de tipo salvaje AGATAA en ACTTAA en las construcciones humanas o de murinos que promovían la mayor actividad del promotor (Figura 7). Las construcciones mutantes, hCp405mutGATA y mCp646mutGATA, se construyeron con un protocolo de PCR con superposición (Ho S.N. et al., (1989) *Gene (Amst)* 77: 51-59). Brevemente, se generaron dos productos de PCR separados, uno para cada mitad del producto híbrido, con un oligonucleótido GATA mutado orientado en el sentido del marco de lectura o antisentido y un cebador externo. Los dos productos se purificaron y mezclaron. Luego se efectuó una segunda PCR usando los dos cebadores externos. El producto de la PCR fue digerido con *Sac* I y *Hind* III, y se ligó en el vector básico pGL3 digerido con *Sac* I y *Hind* III. Todas las construcciones fueron

confirmadas mediante mapeo de restricción y secuenciación del ADN. Las mutaciones en el elemento GATA eran las mismas que las efectuadas en la sonda GATA mutante que se utiliza en los EMSA. Cuando eran transfectadas en HL-5, las construcciones mutantes humanas y de murinos presentaban un 10% o 42% de actividad promotora en comparación con sus respectivas secuencias de tipo salvaje. Estos resultados muestran que los elementos GATA proximales son necesarios para la expresión constitutiva de los genes de corina humana o de murinos en cardiomiocitos cultivados.

Los ejemplos precedentes se pueden repetir con un éxito similar sustituyendo los reactivos genérica o específicamente descritos y/o las condiciones operativas de esta invención por los utilizados en los ejemplos precedentes.

En tanto la invención se ilustró con respecto a las nuevas regiones de control de la expresión para el gen de corina humano o de ratón, resulta evidente que es posible efectuar variaciones y modificaciones de la invención sin apartarse del espíritu o alcance de la invención.

REIVINDICACIONES:

1. Un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero, donde dicha región de control modula la transcripción de un polinucleótido heterólogo al cual está ligado operativamente.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde dicha región de control modula la transcripción de un mamífero gen de corina de mamífero.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde la transcripción tiene lugar en el tejido cardíaco.
4. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde la región de control comprende un elemento de regulación de la transcripción seleccionado del grupo formado por sitios de unión a GATA, Tbx-5, NKx2.5 o NF-AT.
5. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde la región de control se une a proteínas reguladoras de la transcripción, donde dichas proteínas se seleccionan del grupo formado por GATA-4, Tbx-5, Nkx2.5, factor tipo Kruppel o factor de transcripción NF-AT.
6. El polinucleótido de la reivindicación 1, donde el mamífero es un ser humano.
7. El polinucleótido de la reivindicación 6, donde el polinucleótido presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 4.

8. El polinucleótido de la reivindicación 6, donde el polinucleótido presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 5.
9. El polinucleótido de la reivindicación 6, donde el polinucleótido presenta la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 6.
10. Un fragmento, o una variante, del polinucleótido de la reivindicación 1, donde dicho fragmento o variante puede transcribir el polinucleótido heterólogo al cual está ligado operativamente.
11. El fragmento, o la variante, de la reivindicación 10, donde dicho fragmento o variante tiene una secuencia que es al menos un 70% idéntica a la SEQ ID N°: 4.
12. El fragmento o la variante de la reivindicación 10, donde dicho fragmento o dicha variante tiene una secuencia que es al menos un 70% idéntica a la SEQ ID N°: 5.
13. El fragmento o la variante de la reivindicación 10, donde dicho fragmento o variante tiene una secuencia que es al menos un 70% idéntica a la SEQ ID N°: 6.
14. Un vector que comprende la región de control de la expresión de corina de la reivindicación 1.
15. Una célula huésped que comprende al vector de la reivindicación 14.
16. Un método para producir un polipéptido que comprende expresar en la célula huésped de la reivindicación 15 un

polipéptido codificado por un polinucleótido heterólogo ligado operativamente a la región de control de la expresión de corina.

17. Un método para producir un polinucleótido que comprende expresar en la célula huésped de la reivindicación 15 una molécula antisentido codificada por un polinucleótido heterólogo ligado operativamente a la región de control de la expresión de corina.

18. Una composición farmacéutica que comprende al vector de la reivindicación 14 en un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

19. Una composición farmacéutica que comprende la célula de la reivindicación 15 en un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

20. Un método para identificar un agente que modula la expresión de un gen de corina humano en una célula, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante que contenga un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero ligado operativamente a un gen informante;

(b) transfectar la célula con el vector recombinante;

(c) tratar la célula con el agente;

(d) medir el nivel de expresión de la secuencia informante en la célula tratada; y

(e) comparar el nivel de expresión de la secuencia informante en presencia del agente con el nivel de expresión en una célula control transfectada que no ha sido tratada.

21. El método de la reivindicación 20, donde la célula es un miocito cardíaco.

22. Un método para modular la expresión de un gen en un sujeto humano, donde dicho método comprende:

(a) producir un vector recombinante que contenga un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero ligado operativamente a un polinucleótido heterólogo;

(b) administrar el vector en una cantidad eficaz en términos terapéuticos a dicho sujeto.

23. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE dicho polinucleótido heterólogo codifica una proteína terapéutica tal como corina, ANP, péptido natriurético de tipo B, fosfolambano, ACE o formas dominantes negativas de estos genes.

24. El método de la reivindicación 23, donde el polinucleótido heterólogo codifica corina.

25. El método de la reivindicación 22, donde el polinucleótido heterólogo codifica un polinucleótido terapéutico tal como una molécula de ARN antisentido o una molécula de ARN catalítica.

26. El método de la reivindicación 22, donde la región de control se selecciona del grupo formado por la SEQ ID N°: 4, la SEQ ID N°: 5 o la SEQ ID N°: 6.

27. Un método de tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión o infarto de miocardio en un sujeto humano, donde dicho método comprende administrar una cantidad eficaz en términos terapéuticos de un polinucleótido aislado que comprende una región de control de la expresión de corina de mamífero, ligado operativamente a un gen seleccionado del grupo formado por corina, ANP, péptido natriurético de tipo B, fosfolambano, ACE o formas dominantes negativas de estos genes, a dicho sujeto.

28. El método de la reivindicación 27, donde dicho gen es de corina.