

Ácido nucleico con actividad promotora y uso del mismo

Campo de la invención

La presente solicitud está relacionada con los campos de la genética, la terapia génica y la biología molecular. Más específicamente, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que tiene actividad promotora (variantes), un casete de expresión y un vector basado en el mismo, una célula huésped para producir un producto diana o vector de expresión.

Antecedentes de la invención

Un promotor es un elemento de ADN que promueve la transcripción de un polinucleótido al que el promotor está vinculado de forma operativa. El promotor puede además formar parte de un elemento promotor/potenciador. Aunque los límites físicos entre los elementos promotores y potenciadores no siempre están claros, el promotor suele referirse a un lugar de una molécula de ácido nucleico al que se une una ARN polimerasa y/o cualquier factor asociado y en el que se inicia la transcripción. Los reforzadores potencian la actividad del promotor tanto temporal como espacialmente. Se sabe que muchos promotores son transcripcionalmente activos en una amplia gama de tipos celulares. Los promotores pueden dividirse en dos clases, los que funcionan de forma constitutiva y los que están regulados por inducción o desrepresión. Ambas clases son adecuadas para la expresión de proteínas. Los promotores que se utilizan para la producción de alto nivel de polipéptidos en células eucariotas y, en particular, en células de mamíferos, deben ser fuertes y preferiblemente activos en una amplia gama de tipos de células. Los promotores constitutivos fuertes que son capaces de impulsar la expresión en muchos tipos de células son bien conocidos en la técnica y, por lo tanto, no es necesario describirlos aquí en detalle.

Ejemplos de promotores y/o potenciadores son promotores y/o potenciadores derivados de LTR retroviral, citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, promotor/potenciador CMV), virus simio 40 (SV40) (por ejemplo, promotor/potenciador SV40), adenovirus, (por ejemplo, promotor mayor tardío de adenovirus (AdMLP)), promotor CAG, así como promotores fuertes de mamíferos como el promotor TTR o el promotor EF1- α .

El promotor CMV, dependiendo del subtipo, tiene una longitud de 589 a 1650 pb (Changyu Zheng ET ALL., All Human EF1 α Promoters Are Not Equal: Markedly Affect Gene Expression in Constructs from Different Sources, Int J Med Sci. 2014; 11(5): 404-408, doi: 10.7150/ijms.8033). El promotor CAG (CMV de etapa inicial/promotor de la β -actina de pollo) tiene una longitud de 868 pb (Nieuwenhuis, B., Haenzi, B., Hilton, S. *et al.* Optimization of adeno-associated viral vector-mediated transduction of the corticospinal tract: comparison of four promoters. *Gene Ther.* 2021; 28: 56–74, <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0169-1>).

Todos los promotores mencionados tienen una longitud superior a 588 pb. Los promotores con una longitud superior a 588 pb en los casetes de expresión no son las opciones óptimas para la expresión de grandes transgenes utilizando una serie de vectores de expresión.

Por lo tanto, es necesario crear promotores cortos.

Muchos promotores, incluido el promotor CMV, no son específicos de tejido, es decir, no permiten la expresión selectiva de transgenes terapéuticos en células de determinados órganos, lo que constituye una desventaja aparente de estos promotores cuando se utilizan para crear un producto de terapia génica.

Así pues, es necesario crear promotores específicos de tejido que permitan la expresión selectiva de transgenes terapéuticos en células de determinados órganos.

Divulgación de la esencia de la invención

Los autores de la invención han encontrado sorprendentemente que un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que comprende SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 tiene actividad promotora. Los promotores que tienen la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 tienen una longitud que oscila entre 123 y 252 pb. Además, los autores de la invención han encontrado sorprendentemente que los promotores que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 tienen actividad promotora específica de tejido en células de origen hepatocítico.

Definiciones y métodos generales

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular. Normalmente, la presente clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son bien conocidos por los expertos y ampliamente utilizados en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se llevan a cabo según las directrices del fabricante, como es habitual en la técnica, o como se describe en el presente documento.

Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, se entenderá que las palabras "incluye" y "comprende", o variaciones de las mismas como "incluye", "incluyendo", "comprende" o "comprendiendo", implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Moléculas de ácido nucleico

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos" utilizados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que determina un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es un ADN o ARN de doble cadena, un ADN o ARN de cadena simple, o productos de transcripción de dichos ADN.

Tal como se utiliza en la presente descripción, los polinucleótidos incluyen, como ejemplos no limitantes, a modo de ejemplos no limitativos, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, como ejemplos no limitativos, los medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando la tecnología de clonación ordinaria y la PCR y similares, y por medios sintéticos.

También debe incluirse aquí que la presente invención no se refiere a las secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, han sido muestreadas directa o indirectamente, por ejemplo, mediante copia, por lo que su entorno ha sido modificado al menos parcialmente. Así, también deben mencionarse aquí los ácidos nucleicos aislados obtenidos mediante genética recombinante, por ejemplo, utilizando células huésped, u obtenidos mediante síntesis química.

A menos que se indique lo contrario, el término secuencia de nucleótidos abarca su complemento. Por lo tanto, un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria del mismo con la secuencia complementaria del mismo.

Vector

El término "vector", tal y como se utiliza aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Además, el término "vector" se refiere aquí a una partícula viral recombinante capaz de transportar un ácido nucleico.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término "expresión" se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos concreta impulsada por su promotor.

Descripción detallada de la invención

Ácido nucleico

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que tiene actividad promotora e incluye una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es aquella que se identifica y separa de al menos una molécula-impureza de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o conjunto en que se encuentra en condiciones naturales. Así, una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de una molécula de ácido nucleico que existe en las células en condiciones naturales.

Todos los ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 tienen actividad promotora.

Todos los promotores que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 tienen actividad promotora específica de tejido en células de origen hepatocítico.

Todos los promotores que tienen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 son promotores fuertes y su uso como parte de vectores de expresión conduce a un aumento de los niveles de producción y actividad de la proteína diana.

Casete de expresión. Vector de expresión

En un aspecto, la presente invención se refiere a un casete de expresión que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores que tienen actividad promotora.

El término "casete que expresa" o "casete de expresión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere en particular a un fragmento de ADN que es capaz, en un entorno apropiado, de desencadenar la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, cuya secuencia está incluida en dicho casete de expresión. Cuando se introduce en una célula huésped, el casete de expresión es capaz, entre otras cosas, de activar los mecanismos celulares para transcribir el polinucleótido que codifica el polipéptido de interés en ARN que, a continuación, suele ser procesado y finalmente traducido en el polipéptido de interés. El casete de expresión puede estar contenido en un vector de expresión.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

- una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera);
- cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores con actividad promotora;
- un transgén;
- una señal de poliadenilación;
- un ITR derecho (segundo).

Los elementos estructurales anteriores del casete de expresión están unidos entre sí de forma operable.

Tal y como se utiliza aquí, el término "operablemente enlazado" se refiere a una unión de elementos polinucleotídicos (o polipeptídicos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está "operativamente enlazado" cuando está presente en condiciones de relación funcional con otra secuencia

de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia reguladora de la transcripción está vinculada operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de dicha secuencia codificante. El término "enlazadas operablemente" significa que las secuencias de ADN enlazadas son típicamente contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificadoras de proteínas, también son contiguas y están presentes en el marco de lectura.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye una ITR izquierda (primera) con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye una señal de poliadenilación con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye una ITR derecha (segunda) con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye los siguientes elementos en la dirección del extremo 5' al extremo 3':

- una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera) con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16;

- un promotor con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15;

- un transgén;

- una señal de poliadenilación con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17;

- una ITR derecha (segunda) con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye un transgén que codifica una proteína o un pequeño ácido nucleico inhibidor.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye un transgén que codifica una proteína que se selecciona de un grupo que comprende el factor VIII o una variante funcional del mismo, el factor IX o una variante funcional del mismo, la proteína SMN1 (proteína de neurona motora de supervivencia), el polipéptido RBD-S de SARS-cov-2, o un anticuerpo terapéutico.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que incluye cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores que tienen actividad promotora o cualquiera de los casetes de expresión anteriores.

En algunas realizaciones de la invención, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un sitio bacteriano de origen de replicación y vectores episomales). En otras realizaciones de la invención, los vectores (por ejemplo, los vectores no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras su introducción en una célula huésped, y por tanto se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma

operativa. Dichos vectores se denominan aquí "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas, como el virus del mosaico de la coliflor, el virus del mosaico del tabaco, cósmidos, cromosoma artificial de levadura, VEB, y similares. Las moléculas de ADN pueden insertarse a un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y traslacional dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del ADN. Pueden elegirse un vector de expresión y secuencias de control de expresión que sean compatibles con la célula huésped de expresión utilizada. Las moléculas de ADN pueden introducirse en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligando sitios de restricción complementarios, o ligando el extremo romo si no hay sitios de restricción).

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un plásmido, AAV, adenovirus o lentivirus.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un plásmido, es decir, un ADN circular de doble cadena en el que pueden insertarse segmentos de ADN adicionales.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un vector viral (de expresión), en el que pueden insertarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral.

En algunas realizaciones, el vector de expresión es un virus adeno-asociado recombinante (AAV).

En algunas realizaciones, el AAV se selecciona de un grupo que incluye los siguientes serotipos de AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-l, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2.6, rAAV2.8, rAAV2.9, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10, AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 o AAV.HSC16.

En algunas realizaciones de la invención, el vector o casete, aparte de un promotor, puede incluir otra secuencia de control de la expresión. El término "otra secuencia de control de expresión", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a secuencias polinucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se insertan. Los expertos en la materia entenderán que el diseño de un vector o casete de expresión, incluida la selección de las secuencias de control de la expresión, puede depender de factores como la elección del tipo de célula huésped que se va a transformar, el nivel requerido de expresión de una proteína, etcétera. Las secuencias de control de la expresión, aparte de un promotor, incluyen las correspondientes secuencias de iniciación, terminación y potenciación de la transcripción; señales de procesamiento eficiente del ARN, como

señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y, si se desea, secuencias que mejoran la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión al ribosoma, así como secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotas, dichas secuencias de control típicamente incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de expresión abarcan al menos todos los componentes cuya presencia es importante para la expresión y el procesamiento.

Además de los genes y secuencias de control de la expresión mencionados, los vectores de expresión recombinante según la invención pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador de selección facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector o casete.

En una realización de la presente invención, el vector de expresión se refiere a un vector que comprende una o más secuencias polinucleotídicas de interés, genes de interés o transgenes que están flanqueados por secuencias parvovirales o secuencias de repetición terminal invertida (ITR).

Ni el casete ni el vector de la invención comprenden secuencias de nucleótidos de genes que codifican proteínas no estructurales (Rep) y proteínas estructurales (Cap) del virus adeno-asociado.

Célula huésped

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped para producir un producto diana o para producir cualquiera de los vectores de expresión anteriores, que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos anteriores que tienen actividad promotora.

El término "célula huésped", tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula en la que se ha introducido el vector o casete de expresión recombinante según la invención. Debe entenderse que "célula huésped" se refiere no sólo a una célula en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a una célula parental; sin embargo, dichas células siguen estando incluidas en el alcance del término "célula huésped" tal y como se utiliza aquí.

Los vectores o casetes de expresión según la invención pueden utilizarse para la transfección de una célula de mamífero, vegetal, bacteriana o de levadura. La transfección puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen la transfección mediada por dextrano, la transfección de complejos polímero-ácido nucleico

cati3nico, la precipitaci3n de fosfato c3lcico, la transfecci3n mediada por polibreno, la fusi3n de protoplastos, la encapsulaci3n de los polinucle3tidos en liposomas y la microinyecci3n directa de ADN en los n3cleos. Adem3s, las mol3culas de 3cido nucleico pueden introducirse en c3lulas de mam3fero mediante vectores virales (de expresi3n).

Las l3neas celulares de mam3feros utilizadas como hu3spedes para la transfecci3n son bien conocidas en la t3cnica e incluyen una pluralidad de l3neas celulares inmortalizadas disponibles. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, las c3lulas de ovario de h3mster chino (CHO), las c3lulas NS0, las c3lulas SP2, las c3lulas HEK-293T, las c3lulas FreeStyle 293 (Invitrogen), las c3lulas NIH-3T3, las c3lulas HeLa, las c3lulas de ri3n3n de h3mster beb3 (BHK), las c3lulas de ri3n3n de mono verde africano (COS), las c3lulas de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), las c3lulas A549, SK-HEP1, HUH7, Hep-RG y otras l3neas celulares. Las l3neas celulares se seleccionan determinando qu3 l3neas celulares tienen altos niveles de expresi3n y proporcionan las caracter3sticas necesarias de la prote3na que se est3 produciendo. Otras l3neas celulares que pueden utilizarse son las de insectos, como las c3lulas Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresi3n recombinantes seg3n la invenci3n se introducen en c3lulas hu3sped de mam3fero, la prote3na diana se produce mediante el cultivo de las c3lulas hu3sped durante un periodo de tiempo suficiente para expresar la prote3na diana en las c3lulas hu3sped o, m3s preferiblemente, secretar la prote3na diana en el medio de cultivo en el que se cultivan las c3lulas hu3sped. La prote3na diana puede aislarse del medio de cultivo mediante t3cnicas est3ndar de purificaci3n de prote3nas. Las c3lulas hu3sped vegetales incluyen, por ejemplo, Nicotiana, Arabidopsis, lenteja de agua, ma3z, trigo, patata, etc. Las c3lulas hu3sped bacterianas incluyen las especies Escherichia y Streptomyces. Las c3lulas hu3sped de levadura incluyen Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae y Pichia pastoris.

La c3lula hu3sped anterior no se refiere a una c3lula hu3sped producida utilizando embriones humanos.

La c3lula hu3sped anterior no se refiere a una c3lula hu3sped producida mediante la modificaci3n de la integridad gen3tica de las c3lulas de la l3nea germinal humana.

Breve descripci3n de los dibujos

La figura 1 es un gr3fico que muestra el aumento de la proporci3n de fluorescencia de las c3lulas que expresan la prote3na reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 1 y 2.

Proporci3n de c3lulas que expresan EGFP tras la transfecci3n:

1 - con un casete de expresi3n con transg3n EGFP y sin regi3n promotora (control);

2 - con un casete de expresi3n con el transg3n EGFP y complementado con la regi3n promotora viral del citomegalovirus (CMV) (control);

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 2;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 1.

La figura 2 es un gráfico que muestra el aumento de la proporción de fluorescencia de las células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 3-7 y SEQ ID NO: 11-14.

Proporción de células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 4;

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 5;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 6.

5 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 7;

6 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 13;

7 - con un casete de expresión con transgén EGFP bajo control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14;

8 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

9 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 12;

10 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3.

La figura 3 es un gráfico que muestra el aumento de la proporción de fluorescencia de las células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 8-10 y 15.

Proporción de células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8;

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 10;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 9;

5 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 15.

La Figura 4 es un gráfico que muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia de las células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 3-7 y SEQ ID NO: 11-14.

Intensidad de fluorescencia de las células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 4;

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 5;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 6.

5 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 7;

6 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 13;

7 - con un casete de expresión con transgén EGFP bajo control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14;

8 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

9 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 12;

10 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia de las células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 8-10 y 15.

Intensidad de fluorescencia de las células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8;

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 10;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 9;

5 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 15.

La Figura 6 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de producción de la proteína de la coagulación mientras se utilizan ácidos nucleicos que presentan actividad promotora y que corresponden a las secuencias de SEQ ID NO: 3, 11 y 14.

Niveles de producción de la proteína de coagulación durante la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén del factor de coagulación y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3;

3 - con un casete de expresión en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

4 - con un casete de expresión en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14.

La figura 7 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de actividad de la proteína de la coagulación mientras se utilizan ácidos nucleicos que exhiben actividad promotora y que corresponden a las secuencias de SEQ ID NO: 3, 11 y 14.

Niveles de actividad de la proteína de la coagulación durante la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén del factor de coagulación y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3;

3 - con un casete de expresión en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

4 - con un casete de expresión en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14.

La figura 8 es un gráfico de medición de la especificidad tisular de las secuencias recién producidas en las líneas celulares Huh7 y U87, que muestra un aumento de la proporción de células que

expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 3-7 y SEQ ID NO: 11-14.

Proporción de células que expresan EGFP tras la transfección:

- 1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);
- 2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 4;
- 3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 5;
- 4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 6.
- 5 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 7;
- 6 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 13;
- 7 - con un casete de expresión con transgén EGFP bajo control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14;
- 8 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;
- 9 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 12;
- 10 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3.

La Figura 9 es un gráfico de medición de la especificidad tisular de las secuencias recién producidas en las líneas celulares Huh7, HepG2 y HEK293, que muestra un aumento de la proporción de células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 7 y 11.

Proporción de células que expresan EGFP tras la transfección:

- 1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);
- 2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 7;
- 3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11.

La figura 10 es un gráfico de medición de la especificidad tisular de las secuencias producidas en la línea celular CHO, que muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia de las células que

expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 1 y 2.

Intensidad de fluorescencia de las células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP y complementado con la región promotora viral del citomegalovirus (CMV) (control);

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 2;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 1.

La figura 11 es un gráfico de medición de la especificidad tisular de las secuencias producidas en la línea celular HepG2, que muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia de las células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 1 y 2.

Intensidad de fluorescencia de las células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP y complementado con la región promotora viral del citomegalovirus (CMV) (control);

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 2;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 1.

La figura 12 es un gráfico de medición de la especificidad tisular de las secuencias producidas en las líneas celulares Huh7 y U87, que muestra el aumento de la intensidad de la fluorescencia de las células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 3-7 y SEQ ID NO: 11-14.

Intensidad de fluorescencia de las células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 4;

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 5;

4 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 6.

5 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 7;

6 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 13;

7 - con un casete de expresión con transgén EGFP bajo control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14;

8 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

9 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 12;

10 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3.

La Figura 13 es un gráfico de medición de la especificidad tisular de las secuencias producidas en las líneas celulares Huh7, HepG2 y HEK293, que muestra el aumento de la intensidad de fluorescencia de las células que expresan la proteína reportera EGFP bajo el control de los promotores correspondientes a las secuencias nucleicas de SEQ ID NO: 7 y 11. Intensidad de fluorescencia de las células que expresan EGFP tras la transfección:

1 - con un casete de expresión con transgén EGFP y sin región promotora (control);

2 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 7;

3 - con un casete de expresión con el transgén EGFP bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11.

La figura 14 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de producción de proteína de coagulación durante la administración de un casete de expresión que comprende una secuencia de factor de coagulación bajo el control de regiones promotoras correspondientes a SEQ ID NO: 3, 8, 11 y 14, en forma de un vector de expresión basado en AAV.

Niveles de producción de la proteína de coagulación durante la transducción:

1 - con un vector de expresión que comprende un casete con el transgén del factor de coagulación y sin una región promotora (control);

2 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8;

3 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

4 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14;

5 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3;

La Figura 15 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de actividad de la proteína de coagulación durante la administración de un casete de expresión que comprende una secuencia de factor de coagulación bajo el control de regiones promotoras correspondientes a SEQ ID NO: 3, 8, 11 y 14, en forma de un vector de expresión basado en AAV.

Niveles de actividad de la proteína de coagulación durante la transducción:

1 - con un vector de expresión que comprende un casete con el transgén del factor de coagulación y sin una región promotora (control);

2 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8;

3 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

4 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 14;

5 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 3;

La Figura 16 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de producción de proteína de coagulación durante la administración de un casete de expresión que comprende una secuencia de factor de coagulación bajo el control de las regiones promotoras correspondientes a SEQ ID NO: 8 y 11, en forma de un vector de expresión basado en rAAV5 o rAAV6.

Niveles de producción de la proteína de coagulación durante la transducción:

1 - con un vector de expresión que comprende un casete con el transgén del factor de coagulación y sin una región promotora (control);

2 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

3 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8.

La Figura 17 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de actividad de la proteína de coagulación durante la administración de un casete de expresión que comprende una secuencia de factor de coagulación bajo el control de las regiones promotoras correspondientes a SEQ ID NO: 8 y 11, en forma de un vector de expresión basado en rAAV5 o rAAV6.

Niveles de actividad de la proteína de coagulación durante la transducción:

1 - con un vector de expresión que comprende un casete con el transgén del factor de coagulación y sin una región promotora (control);

2 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11;

3 - con un vector de expresión que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8.

La Figura 18 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de la proteína del factor de coagulación bajo el control de las regiones promotoras correspondientes a los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 y 11 cuando se administra como un vector de expresión basado en AAV *in vivo* a ratones B6.129S-F8tm1Smoc.

Niveles de proteína del factor de coagulación en el plasma animal tras la inyección:

1 - solución de control sin AAV (control negativo).

2 - con un vector de expresión basado en AAV que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8.

3 - con un vector de expresión basado en AAV que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11.

La Figura 19 es un gráfico que muestra el aumento de los niveles de actividad del factor de coagulación bajo el control de las regiones promotoras correspondientes a los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 y 11 cuando se administra como un vector de expresión basado en AAV *in vivo* a ratones B6.129S-F8tm1Smoc.

Niveles de proteína del factor de coagulación en el plasma animal tras la inyección:

1 - solución de control sin AAV (control negativo).

2 - con un vector de expresión basado en AAV que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 8.

3 - con un vector de expresión basado en AAV que comprende un casete en el que el transgén del factor de coagulación está bajo el control de un promotor correspondiente a la secuencia nucleica de SEQ ID NO: 11.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como una restricción del alcance de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan aquí por remisión. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de la comprensión, será fácilmente aparente para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer a la misma ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o del alcance de las realizaciones anexas.

Materiales y métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012. Los reactivos de biología molecular se utilizaron según los protocolos del fabricante. En resumen, se produjo ADN plasmídico para su posterior manipulación en células de E. coli cultivadas bajo presión selectiva de antibióticos para que los plásmidos no se perdieran en la población celular. Aislamos el ADN plasmídico de las células utilizando kits comerciales, medimos la concentración y lo utilizamos para la clonación mediante el tratamiento con endonucleasas de restricción o la amplificación por PCR. Los fragmentos de ADN se ligaron entre sí utilizando ligasas y se transformaron en células bacterianas para la selección de clones y la producción posterior. Todas las construcciones genéticas resultantes se confirmaron mediante patrones de restricción y secuenciación de Sanger completa.

Determinación de la secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de Sanger. Se analizaron las secuencias de ADN y proteínas y los datos de las secuencias se procesaron en SnapGene Viewer 4.2 o superior para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

Cultivo de células

En los experimentos se utilizaron líneas celulares HEK293 (clon 293 de riñón embrionario humano), HUH7 (líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano), U87-MG (líneas celulares de

glioma maligno Uppsala 87), CHO-K1-S (líneas celulares de ovario de hámster chino) y HepG2 (líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano). Las células HEK293 en suspensión utilizadas para producir el AAV se cultivaron en condiciones estándar a 37 °C y 5% de CO₂ en un medio de cultivo completo sin FBS y sin antibiótico. Las células HEK293, HUH7 y HepG2 adherentes utilizadas para probar la eficacia de la expresión de los productos EGFP y AAV se cultivaron en condiciones estándar a 37°C y 5% de CO₂, en un medio DMEM completo suplementado con 10% de FBS, antibiótico/antimicótico. Las células adherentes U87-MG y CHO-K1-S utilizadas para las pruebas de especificidad tisular se cultivaron en condiciones estándar a 37 °C y 5% de CO₂ en un medio nutritivo EMEM completo suplementado con 10% de FBS, antibiótico/antimicótico, y medio DMEM/F12 suplementado con 5% de FBS, antibiótico/antimicótico, respectivamente.

Las células se subcultivaron al alcanzar entre el 80 y 90% de confluencia. Se utilizó la enzima TrypLE Select (10x) para disociar la monocapa celular. La viabilidad de las células se evaluó mediante la tinción con azul tripán y cámaras de recuento de células desechables utilizando un contador automático Countess II.

Transfección de cultivos celulares

Para evaluar la actividad funcional de las nuevas variantes del promotor durante la transfección, utilizamos plásmidos que comprendían un casete de expresión para la expresión de diversas variantes de transgenes de EGFP y factor de coagulación. Las líneas celulares modelo se sembraron previamente en los pocillos de placas de 12 pocillos a una densidad de 10000 células/cm². Un día después, añadimos un número igual de copias de ADN plasmídico de las muestras de ensayo y de control como parte de un complejo con Lipofectamine 3000. Para las variantes de transgén basadas en el gen que codifica la proteína verde fluorescente (EGFP), el día 3 tras la transfección, determinamos la proporción de células que expresaban EGFP y la intensidad de la fluorescencia celular mediante citometría de flujo. Para la variante del transgén basada en el factor de coagulación, el día 7 tras la transfección, determinamos el contenido de proteína de coagulación y su actividad en el medio de cultivo mediante ELISA y ensayo cromogénico. Las células intactas de la línea modelo se utilizaron como control negativo.

Generación y purificación de partículas virales de vectores recombinantes AAV

Para producir partículas virales AAV recombinantes que incluyeran un transgén basado en el factor de coagulación, utilizamos células productoras HEK293 transfectadas con 3 plásmidos:

- Un plásmido que comprende un casete de expresión AAV para la expresión del factor de coagulación;
- Un plásmido que comprende genes Cap del serotipo AAV6/AAV5 y genes Rep del serotipo AAV2. Cada gen, utilizando marcos de lectura alternativos, codifica varios productos proteicos;

- Plásmido que contiene genes de adenovirus Ad2 necesarios para el ensamblaje y empaquetado de cápsides de AAV.

72 horas después de la transfección, las células se lisaron y, a continuación, las partículas virales se purificaron y concentraron mediante métodos de filtración, cromatografía y ultracentrifugación. El título de las partículas virales se determinó mediante PCR cuantitativa con cebadores y una muestra específica para la región del genoma viral recombinante y se expresó como el número de copias de genomas virales por 1 ml.

Transducción de cultivos celulares

La línea celular HUH7 se sembró previamente en los pocillos de placas de 12 pocillos a una densidad de 10.000 células/cm². Después de fijar las células al sustrato adhesivo, se introdujeron preparaciones de AAV a una MOI de 500.000 vg/célula. El día 7 después de la transducción, se determinaron el nivel y la actividad de la proteína de coagulación en el líquido de cultivo mediante ELISA y ensayo cromogénico. Los estudios relativos a la evaluación del nivel y la actividad de la proteína de coagulación en el líquido de cultivo se realizaron en 6 experimentos independientes. Se utilizaron células intactas como control negativo.

Determinación de la proporción de células que expresan la proteína reportera EGFP y de la intensidad de la fluorescencia celular mediante citometría de flujo.

Para evaluar la expresión de la proteína reportera EGFP en un citofluorómetro de flujo, el día 3 siguiente a la transfección se añadió a los precipitados celulares una mezcla previamente preparada de tampón y yoduro de propidio (PI) a razón de 1 µl de PI a una concentración de 10 µg/ml por 1 ml de tampón. Las células no teñidas con PI y no transfectadas con ADN plasmídico (isotipo) se transfirieron a los pocillos de una microplaca de 96 pocillos para evaluar la compensación. Se añadió una mezcla de tampón/PI a los pocillos restantes de la microplaca para medir los controles con PI y las muestras. Tras transferir las muestras celulares a la microplaca, se incubaron durante 5 minutos en ausencia de luz. Tras la incubación, las microplacas con las muestras de células de ensayo se cargaron en un citómetro de flujo para su análisis. Se utilizó citometría de flujo para determinar el porcentaje de células que contenían EGFP, así como la intensidad media de la señal de fluorescencia. Cada muestra se midió en tres réplicas técnicas (el número de eventos analizados no es inferior a 10.000).

Determinación de la cantidad de proteína del factor de coagulación mediante ELISA

El contenido de la proteína del factor de coagulación en el líquido de cultivo tras la transfección de células HUH7 y la transducción con candidatos diana se evaluó mediante el método sándwich de enzimoimmunoanálisis en fase sólida no competitivo (ELISA). Brevemente, las muestras de líquido de cultivo diluidas en un tampón comercial se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos sensibilizada con anticuerpos primarios específicos del factor de coagulación. La misma microplaca se cargó con estándares para trazar una curva de calibración, controles. La placa se incubó durante 1 hora a una

temperatura de 37°C. Los pocillos de la microplaca se lavaron con tampón antes de introducir los anticuerpos biotinilados, la solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante y el sustrato de tetrametilbencidina (TMB). A continuación, se introdujo una solución con anticuerpos detectores de factores de coagulación específicos biotinilados y se incubó la microplaca durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C. Se añadió al complejo resultante una solución de conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano picante, y se incubó la placa durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C. Se introdujo una solución de TMB para visualizar la reacción enzimática. Una vez alcanzado el grado de intensidad de tinción requerido, se añadió una solución stop a todos los pocillos para detener la reacción. Tras detener la reacción, se midió la densidad óptica. La concentración del factor de coagulación en las muestras de ensayo se midió mediante la normalización de la tinción cromogénica por la curva de calibración de la muestra estándar, teniendo en cuenta el factor de predilución.

Determinación del nivel de actividad de la proteína del factor de coagulación mediante ELISA

La actividad de la proteína del factor de coagulación en el medio de cultivo tras la transfección de células HUH7 y la transducción con candidatos diana y muestras de control se evaluó mediante un ensayo cromogénico. El ensayo se basa en el hecho de que en presencia de iones de calcio, fosfolípidos y factor IXa, el factor X se transforma en la forma activada Xa, el factor VIII funciona como cofactor en la reacción, y la tasa de activación del factor X está linealmente asociada al nivel de factor VIII. Brevemente, las muestras de medio de cultivo diluidas en un tampón comercial, los estándares para trazar una curva de calibración y los controles se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos. A continuación, las muestras se sometieron a incubación durante 3 minutos a una temperatura de 37 °C, seguida de la introducción, en los pocillos de la microplaca, de la solución reactiva Factor, que comprende factor IXa, factor X, trombina, CaCl₂ y fosfolípidos. A continuación, la microplaca se incubó durante 4 minutos a una temperatura de 37 °C, seguida de la introducción de la solución de sustrato cromogénico S-2765+I-2581 en los pocillos. A continuación, la placa se incubó durante 7 minutos a una temperatura de 37 °C. Una vez alcanzado el grado requerido de intensidad de tinción, se añadió una solución al 20% de ácido acético a todos los pocillos para detener la reacción. A continuación, se midió la densidad óptica de las soluciones en los pocillos de la microplaca. La actividad del factor de coagulación en las muestras de ensayo se midió mediante la normalización de la tinción cromogénica por la curva de calibración de la muestra estándar, teniendo en cuenta la dilución preliminar.

Estudio in vivo en animales de laboratorio

Para los experimentos se utilizaron ratones B6.129S-F8tm1Smoc deficientes del factor de coagulación (machos de 6-8 semanas de edad). Los productos se administraron a los animales mediante una única inyección intravenosa en la vena de la cola. Se administró una solución tampón sin AAV al grupo de animales de control negativo. Se tomaron muestras de plasma sanguíneo el día de la inyección,

antes de administrar los productos, y el día 70 después de introducir los vectores de expresión. Todos los ensayos con animales se realizaron respetando plenamente las directrices ARRIVE.

Análisis de datos estadísticos

Los resultados indican un valor medio $\pm$ desviación estándar (SD), se empleó un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional seguido de comparaciones múltiples por pares de Dunnett para comparar los resultados del experimento, y se determinó que eran estadísticamente significativos.

Ejemplo 1.

Para aumentar los niveles de expresión del gen de interés, al diseñar las construcciones genéticas utilizamos un panel de promotores (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) que se desarrollaron en función de los sitios de unión a factores de transcripción. Estas secuencias de nucleótidos como parte de un casete de expresión consistente en un ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierdo (primero) correspondiente a la secuencia de SEQ ID NO: 16, un promotor seleccionado de un grupo que comprende: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, el gen de interés, una señal de poliadenilación (SEQ ID NO: 17), una ITR derecha (segunda) (SEQ ID NO: 18), en el que el gen de interés puede ser una secuencia de proteína verde fluorescente (GFP) o una secuencia de proteína de la cascada de coagulación, se ensayaron *in vitro* mediante transfección de líneas celulares modelo (HEK293, HUH7, U87-MG, CHO-K1-S y HepG2). Se utilizó como control un casete de expresión que comprendía una ITR izquierda (primera) (SEQ ID NO: 16), el gen de interés, una señal de poliadenilación (SEQ ID NO: 17), una ITR derecha (segunda) (SEQ ID NO: 18). Las figuras 1 y 2 también muestran controles adicionales que comprenden los mismos elementos del casete de expresión complementados con un promotor viral constitutivo de citomegalovirus (CMV).

Todos los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, que son regiones promotoras, proporcionan una mayor proporción (Figura 1-3) de células que expresan la proteína reportera EGFP y una mayor intensidad de fluorescencia EGFP (Figura 4-5) cuando se utiliza la secuencia de proteína verde fluorescente como gen de interés. Cuando se utilizó la secuencia del factor de coagulación como gen de interés, también observamos mayores niveles de producción (Figura 6) y actividad (Figura 7) de la proteína de coagulación en comparación con el uso del ácido nucleico del gen de interés sin región promotora. Así, los ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 1-15) muestran actividad promotora como parte de un casete de expresión con diversas variantes de transgenes durante la transfección de líneas celulares modelo (Huh7, CHO-K1-S y HepG2).

Ejemplo 2.

Para medir la especificidad tisular de las secuencias de ácido nucleico desarrolladas (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15), que tienen actividad promotora, las secuencias de nucleótidos se probaron durante la transfección en líneas celulares modelo (HEK293, HUH7, U87-MG,

CHO-K1-S y HepG2) *in vitro* como parte de un casete de expresión formado por una ITR (repeticiones terminales invertidas) izquierda (primera) correspondiente a la secuencia de SEQ ID NO: 16, un promotor (SEQ ID NO: 1-15), el gen de interés, una señal de poliadenilación (SEQ ID NO: 17), una ITR derecha (segunda) (SEQ ID NO: 18), donde el gen de interés puede estar representado por una secuencia de proteína EGFP o ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la cascada de coagulación. Se utilizó como control un casete de expresión que comprendía una ITR izquierda (primera) (SEQ ID NO: 16), el gen de interés, una señal de poliadenilación (SEQ ID NO: 17), una ITR derecha (segunda) (SEQ ID NO: 18). Asimismo, en las Figuras 8, 10, 11 y 12 se utilizó un control que comprendía los mismos elementos del casete de expresión complementados con la región promotora viral del citomegalovirus (CMV).

Todos los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, que son regiones promotoras, proporcionan una mayor proporción (Figuras 8 y 9) de células que expresan la proteína reportera EGFP, y una mayor intensidad de fluorescencia EGFP (Figuras 10-13) en líneas celulares de origen hepatocítico en comparación con el uso de un ácido nucleico sin región promotora. Así, los ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) tienen actividad promotora específica de tejido en células de origen hepatocítico.

Ejemplo 3.

Hemos producido vectores de expresión basados en AAV que comprenden casetes de expresión que codifican un transgén (factor de coagulación) bajo el control de los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8, 11 y 14 que tienen actividad promotora. Dichos vectores de expresión se comprobaron transduciendo células Huh7 *in vitro*. Como control se utilizó un vector de expresión basado en AAV sin región promotora.

El uso de vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8, 11 y 14 conducen a mayores niveles de producción (Figura 14) y actividad (Figura 15) de la proteína de coagulación en comparación con el uso del vector de expresión libre de una región promotora. El uso de los vectores de expresión basados en AAV de varios serotipos que comprenden los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 y 11 exhibió mayores niveles de producción (Figura 16) y actividad (Figura 17) de la proteína de coagulación en comparación con los del control. Los resultados corresponden a los obtenidos durante la transfección de células Huh7 (Figuras 6 y 7). Así, los ácidos nucleicos (SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) exhiben actividad promotora mientras se entregan como un vector de expresión con diversas variantes de transgenes durante la transducción de líneas celulares modelo.

Ejemplo 4.

Para medir la actividad promotora de los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 y 11 como parte del vector de expresión *in vivo*, produjimos productos basados en AAV en los que el transgén es un factor de coagulación bajo el control de los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 u 11. A continuación, los productos de ensayo se administraron a ratones de laboratorio B6.129S-F8tm1Smoc. Como control

negativo se utilizó un tampón para la dilución del producto viral, libre de partículas de AAV. Los productos AAV se administraron a los animales una sola vez mediante inyección hidrodinámica intravenosa en la vena de la cola. Se tomaron muestras de plasma sanguíneo el día de la inyección antes de administrar los productos (día 0) y el día 70 después de la administración.

Los estudios *in vivo* mostraron que en el caso de usar los fármacos de prueba que comprenden la secuencia del gen del factor de coagulación bajo el control de los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 y 11 se observó un aumento significativo de la cantidad de factor de coagulación y de su actividad en el plasma de los animales el día 70 después de administrar los productos (Figura 18-19). Así, los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 8 y 11 muestran actividad promotora cuando se administran como un vector de expresión basado en AAV *in vivo*.

Reivindicaciones

1. Un ácido nucleico con actividad promotora, que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.
2. Un casete de expresión que comprende una molécula del ácido nucleico según la reivindicación 1 y un transgén operativamente ligado.
3. El casete de expresión según la reivindicación 2, en el que el transgén codifica una proteína o un pequeño ácido nucleico inhibidor.
4. El casete de expresión según la reivindicación 3, en el que el transgén codifica una proteína que se selecciona del grupo que comprende el factor VIII o una variante funcional del mismo, el factor IX o una variante funcional del mismo, la proteína SMN1 (proteína de neurona motora de supervivencia), el polipéptido RBD-S de SARS-cov-2, o un anticuerpo terapéutico.
5. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 1 o el casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
6. El vector de expresión según la reivindicación 7, que es un plásmido, AAV, lentivirus o adenovirus.
7. El vector de expresión según la reivindicación 8, que es un AAV seleccionado del grupo que comprende los siguientes serotipos de AAV: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15, AAV16, rAAV.rh8, rAAV.rh10, rAAV.rh20, rAAV.rh39, rAAV.Rh74, rAAV.RHM4-l, AAV.hu37, rAAV.Anc80, rAAV.Anc80L65, rAAV.7m8, rAAV.PHP.B, rAAV2.5, rAAV2.6, rAAV2.8, rAAV2.9, rAAV2tYF, rAAV3B, rAAV.LK03, AAV.HSC1, AAV.HSC2, AAV.HSC3, AAV.HSC4, AAV.HSC5, AAV.HSC6, AAV.HSC7, AAV.HSC8, AAV.HSC9, AAV.HSC10 , AAV.HSC11, AAV.HSC12, AAV.HSC13, AAV.HSC14, AAV.HSC15 o AAV.HSC16.
8. Una célula huésped para producir el producto diana o el vector de expresión según las reivindicaciones 5 a 7, que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 1 o el casete de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

Resumen

La presente solicitud está relacionada con los campos de la genética, la terapia génica y la biología molecular. Más específicamente, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que tiene actividad promotora (variantes), un casete de expresión y un vector basado en el mismo, una célula huésped para producir un producto diana o vector de expresión.