

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 479**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014** **PCT/US2014/021357**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14149882**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014** **E 14769821 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 2970969**

54 Título: **Composiciones promotoras**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361794818 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2021

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
2660 University Capitol Center
Iowa City, IA 52242, US**

72 Inventor/es:

**DAVIDSON, BEVERLY, L.;
RODRIGUEZ, EDGARDO y
MAS MONTEYS, ALEJANDRO**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 809 479 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones promotoras

5 **ANTECEDENTES**

Los enfoques actuales de terapias génicas para enfermedades neurodegenerativas no tienen la capacidad para activar y desactivar la expresión del gen terapéutico administrado. Además, los enfoques actuales tampoco tienen la capacidad para dosificar la expresión del gen terapéutico después de la administración. Por lo tanto, actualmente hay una gran necesidad de promotores regulables.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con una secuencia promotora aislada que comprende un ácido nucleico de entre 500 y 1700 nucleótidos de longitud que tiene por lo menos un 98% de identidad con la SEQ ID N°: 1, la SEQ ID N°: 2 o la SEQ ID N°: 7.

La presente invención también se relaciona con un casete de expresión que comprende la secuencia promotora de la invención que es funcional en una célula transformada ligada operativamente a un segmento de ADN preseleccionado que codifica una proteína o un transcrito de ARN.

La presente invención se relaciona además con un vector que comprende el casete de expresión de la invención.

La presente invención también se relaciona con un método para producir células transformadas que comprende los pasos de (i) introducir en las células un ADN recombinante que comprende una secuencia promotora de la invención ligada operativamente a un segmento de ADN para de esa manera obtener células transformadas y (ii) identificar o seleccionar una línea de células transformadas.

La presente invención también se relaciona con una célula transformada que comprende la secuencia promotora aislada de la invención, el casete de expresión de la invención o el vector de la invención.

La presente invención también se relaciona con el vector de la invención, o con la célula transformada de la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un mamífero.

En determinadas formas de realización, se divulga una secuencia promotora aislada que comprende (o que consiste en) un ácido nucleico de entre 500 y 1700 nucleótidos de longitud que tiene por lo menos un 90% de identidad con la SEQ ID N°: 1, la SEQ ID N°: 2, la SEQ ID N°: 3, la SEQ ID N°: 4, la SEQ ID N°: 5, la SEQ ID N°: 6 o la SEQ ID N°: 7. En determinadas formas de realización, el promotor tiene un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID N°: 1, la SEQ ID N°: 2, la SEQ ID N°: 3, la SEQ ID N°: 4, la SEQ ID N°: 5, la SEQ ID N°: 6 o la SEQ ID N°: 7.

En determinadas formas de realización, se divulga un casete de expresión que comprende el promotor que se describió precedentemente, que es funcional en una célula transformada, ligado operativamente a un segmento de ADN preseleccionado que codifica una proteína o un transcrito de ARN. En determinadas formas de realización, el segmento de ADN preseleccionado comprende un gen marcador seleccionable o un gen informante. En determinadas formas de realización, el segmento de ADN preseleccionado codifica una composición terapéutica. En determinadas formas de realización, la composición terapéutica es una molécula de ARNi.

En determinadas formas de realización, se divulga un vector que comprende el casete de expresión que se describió precedentemente. En determinadas formas de realización, el vector es un vector de un virus adenoasociado (AAV).

En determinadas formas de realización, se divulga una célula transformada que comprende el casete de expresión que se describió precedentemente o el vector que se describió precedentemente. En algunas formas de realización, la célula huésped es una célula eucariota. En determinadas formas de realización, la célula eucariota es una célula animal (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana).

En determinadas formas de realización, se divulga un método para producir células transformadas que comprende los pasos de (i) introducir en las células un ADN recombinante que comprende un promotor que se describió precedentemente ligado operativamente a un segmento de ADN para de esa manera obtener células transformadas y (ii) identificar o seleccionar una línea de células transformadas. En determinadas formas de realización, el ADN recombinante es expresado para así impartir una característica fenotípica a las células transformadas. En determinadas formas de realización, las células transformadas presentan una expresión significativamente aumentada de un gen informante cuando es introducido en células derivadas de pacientes con la enfermedad de Huntington en comparación con células derivadas de individuos control.

En determinadas formas de realización, se divulga una célula transformada obtenida mediante el método que se

describió precedentemente.

En determinadas formas de realización, se divulga una célula transformada que comprende el promotor aislado que se describió precedentemente.

En determinadas formas de realización, se divulga una célula transformada que comprende el casete de expresión que se describió precedentemente.

En determinadas formas de realización, se divulga un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un mamífero que comprende administrar (a) el vector que se describió precedentemente o (b) la célula transformada que se describió precedentemente.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1. Un análisis de la expresión de cinco de los promotores demuestra un aumento de la expresión de sus transcritos endógenos en material de cerebro *post mortem* de pacientes con la enfermedad de Huntington en comparación con individuos control sanos.

Figuras 2A-2C. Aumento de la expresión de los transcritos endógenos en el cerebro de ratones con la enfermedad de Huntington a las 6 semanas (Figura 2A); 11 semanas (Figura 2B) y 19 semanas ((Figura 2C).

Figura 3. Actividad de las secuencias genéticas promotoras, clonadas.

Figura 4. Inducción de las secuencias genéticas promotoras, clonadas, demostrada por la expresión de un gen informante (luciferasa).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se relaciona con una secuencia promotora aislada que comprende un ácido nucleico de entre 500 y 1700 nucleótidos de longitud que tiene por lo menos un 98% de identidad con la SEQ ID N°: 1, la SEQ ID N°: 2 o la SEQ ID N°: 7.

La presente invención también se relaciona con un casete de expresión que comprende la secuencia promotora de la invención que es funcional en una célula transformada ligada operativamente a un segmento de ADN preseleccionado que codifica una proteína o un transcrito de ARN.

La presente invención se relaciona además con un vector que comprende el casete de expresión de la invención.

La presente invención también se relaciona con un método para producir células transformadas que comprende los pasos de (i) introducir en las células un ADN recombinante que comprende una secuencia promotora de la invención ligada operativamente a un segmento de ADN para de esa manera obtener células transformadas y (ii) identificar o seleccionar una línea de células transformadas.

La presente invención también se relaciona con una célula transformada que comprende la secuencia promotora aislada de la invención, el casete de expresión de la invención o el vector de la invención.

La presente invención también se relaciona con el vector de la invención, o con la célula transformada de la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un mamífero.

Se divulga el uso de secuencias genéticas promotoras que pueden activar, aumentar o reprimir la expresión de una secuencia genética al comienzo o durante el progreso patológico de un trastorno neurodegenerativo. Esta divulgación es aplicable directamente en el campo de las terapias génicas. Tiene un valor comercial potencial como una herramienta en el desarrollo de enfoques de terapias génicas reguladas para enfermedades neurodegenerativas. Se divulga un medio para dosificar o regular la expresión de genes terapéuticos durante el transcurso de la enfermedad basado en el estado o índice de progreso de la enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, durante el progreso de la enfermedad, las secuencias genéticas promotoras pueden activar la expresión de un gen terapéutico. Si la terapia detiene el progreso de enfermedad, la actividad de la secuencia genética promotora decaerá, lo cual dará como resultado una expresión reducida/limitada del gen terapéutico. Este enfoque dinámico de regulación de la enfermedad con la expresión del gen terapéutico es único y muy necesario en el campo de la terapia génica.

La divulgación es aplicable en el campo de la terapia génica. Satisface la necesidad de regular y/o dosificar genes terapéuticos después de su administración en el cerebro. Los análisis de expresión genética han mostrado que al comienzo y/o durante el transcurso del progreso de una enfermedad neurodegenerativa hay numerosas secuencias genéticas promotoras cuya acción permite "activar", "mejorar", "reprimir" o "desactivar" la expresión de genes. Los inventores de la presente han identificado y clonado secuencias genéticas promotoras que activan y/o mejoran la

expresión genética durante el progreso de una enfermedad neurodegenerativa en modelos de células y animales de dicha enfermedad neurodegenerativa. Estas secuencias genéticas promotoras también pueden activar y/o mejorar la expresión de un gen informante durante el progreso de la enfermedad neurodegenerativa en modelos de dicha enfermedad neurodegenerativa. Este enfoque es único y diferente de los sistemas utilizados actualmente para regular de manera artificial la expresión de genes terapéuticos por cuanto se basa en eventos moleculares relacionados con la enfermedad neurodegenerativa para modular la expresión de dichos genes terapéuticos. Estos eventos, y por consiguiente la actividad de las secuencias genéticas promotoras específicas, son controlados/inducidos por señales intracelulares y/o extracelulares que son dependientes del inicio y/o progreso de la enfermedad.

Los inventores de la presente han identificado, clonado y evaluado la actividad de siete secuencias genéticas promotoras diferentes en células de cultivos tisulares obtenidas de individuos control o de individuos portadores de la mutación del gen de la enfermedad de Huntington (es decir, de una enfermedad neurodegenerativa). Los experimentos demuestran que estas secuencias genéticas promotoras pueden dirigir una expresión significativamente aumentada de un gen informante cuando es introducido en células derivadas de pacientes con la enfermedad de Huntington en comparación con células derivadas de individuos control. Además, la introducción de un estresor artificial, tal como un inhibidor de proteasomas o un estímulo proinflamatorio, da como resultado una actividad aumentada a partir de las secuencias genéticas promotoras medida mediante la expresión de transcritos controlados endógenamente o de un gen informante en células cultivadas. Además, los inventores han detectado un aumento dependiente del progreso de la enfermedad de la actividad de estas secuencias genéticas promotoras, medida mediante un análisis de PCR cuantitativa de transcritos de genes regulados endógenamente, en cerebros de modelos de ratón de la enfermedad de Huntington (es decir, una enfermedad neurodegenerativa).

Secuencias promotoras

Se divulgan las siguientes secuencias promotoras que activan y/o aumentan la expresión genética: peptidasa específica de ubiquitina 31 (USP31, SEQ ID N°: 1), gamma-FBG (SEQ ID N°: 2), familia de H2A histonas, miembro Y (H2AFY, SEQ ID N°: 3), factor de transcripción nuclear Y, gamma (NYFC, SEQ ID N°: 4), transcripto inducible por daño de ADN 3 (CHOP, SEQ ID N°: 5), ARN no codificante 38A (locus 38A, SEQ ID N°: 6) y ARN no codificante 17A (17A, SEQ ID N°: 7).

ID del gen: USP31 (SEQ ID N°: 1)

GGAGGTCATATACTAGTTGATTTGGACtaaaggcatcccaagatgtactatttttgcctctgtctcacatgggaacaactggctggagctgagtgagccacctcttagaaagatgtaattgaagctgtctatagctcccatcattccttatattccccaacactgagacccaagtcactgaaagtcaatatgatgattc
 35 aaacaccaggattctcactcatttgggtttgtgacctgtgatatttggtagctgaccttgggttagaggtcaagtatagggttgtaataaaactgggttgatc
 agataagaactgtaccaatctcaagacggtgaattaaagattaaagaaaatattgcatgctggcataatgttggaacacacagctattgtaaacaccagtag
 gaattgaagctgcaagaggcgaggtagaacccgtgctaatttaaccgctggggatgacatttgatctaatttaatagggttaattcttgcaatatcccaagtaactg
 ctgaatgaatgagtgagtgatgaatgaatgaatgaatgaatgatggagagcccgaggaggttttaaggctggaatgaaaggaaagtagttatgataacagc
 gtttcgtgggactccaaggtgcagccaggaagaaaagcccgctgggacgtgccagggctgtgactgcgctccgtggcaccagagggttaggtatctgcaacg
 40 tccctgggagccagacagggctgactgcccaggacctgtcagggccatgtccaccagctctgcacggtctgtaactgacagcatcctgattcctgcacgttcccg
 cctctgcatctgaccagcaaagacagagacccaccccggtgaccatccaacgggagccagcctttctccaagccgggacggcgccacactagac
 atggcctccctgggcttcacgcagcagcagaccgcccgcagcctccaggcatcgctcggctggagaggcagctaccgtcccacagtgaacatggcgccg
 aggcggcttcacgcgcccggcgccgcccgggagcagctcacgtgagcgtcagctggcgccgacccgcccgcgcccgtggccccgcggcgccgccc
 45 tcgctgcgctgcgctgctgaggtgtgtggcgcttcgagcccccggcgctgagcgcgctggagcgcgctgcccgggagcgcgctgcccggcgccg
 gggccggcgccgcccggcgctgagtgctgcgcccgcgcatgtccaaggttaacggcgccctgggtccgggcccggcgccgcccggcgagcgggaagga
 gaagcgtccttcagcaagcggctgttcggagcggcgctggcgccgcccggcgccgcccggcgccgcttctcgcctcct
 cgccctcctgcacgctcggtgggcAGCTTCATGAGCCGCGTTCTCAAG

ID del gen: gamma-FBG (SEQ ID N°: 2)

TGAGAAGTGAGAGCCTATGAACATGGttgacacagaggacaggaatgtattccagggtcattcattcctgggaatagtgaactgggacatgggg
 50 gaagtcagctcctcctgccacagccagattaaaaataatgttaactgacccataggtctaaataatagtgttaactgacccaaagtaagaagttctttggt
 aattcaggtgatggcagcagaccatcttaaggatagactaggtttgcttagttcagggtcatatctgttgcctcagccatgtactggaagaagttgcatcacacagc
 ctccaggactgccctcctcctcacagcaatggataatgcttactagcctttgcagataatttggatcagagaaaaaccttgagctgggcaaaaaaggaggagctt
 caacctgtgtgcaaaatctgggaacctgacagtataggttggggccaggatgaggaaaaaggaacgggaaagacctgccacccttctgtaaggaggcccc
 55 gtgatcagctccagccatttgagctcctgctatcccaggagcttacataaagggacaattggagcctgagaggtGACAGTGCTGACACTACAAGGC
 TCGG

ID del gen: H2AFY (SEQ ID N°: 3)

CCAAGATCAGCTCTTGGAGGAGTGtagactttaattccacctggtggtccctacagaacggagatccttgcacaaaggcacagagaaggatggaa
 caacaatgtgtgtgtggggagggtctctgcaccttctcagcatcttttctcgaggatcctcatagaaccataatgcttgttttggaccagaagcatcataagcat
 catcattttccagcttcatctcctgttacttcccttccacattctactccaacctcacactcgctctgttctgactatttggacacactcctaccagcctttgacttgcta
 60 ttctcatgctcggcgagtttctccagacatccacacggctgtcctcctcaatttctcaggctttaaattgttactttctcatagaggccttctgttattgagcctcactt
 tatctcacacttctattcccttctccgcttatttttccacccatggagacacctgtgacacattctccgcttctgtcttccccacgagactgcaactacaggag
 ggagagatttctgctgttcttctgttccatccagacccaaatcgatgtatgacacaaaatcgttctcagttacttaatgaattaacgaatgcatgaatggca
 ggtattggacattgttggcaactctaaagtaaggtgaaagcatcccggtgaggtggaggttactgccgctcgattcccgcgagcctgaggactgggggggtggg

ggtggggggtcctaattacctccataatcccagtagcggcactttaaacttcacatcaaccctgagggatgtgtattattatccaaattaggtcacagctggatggaga
agtggcttcgggtccacactttggaggaggaggagtagaggcagggccccatttaagtagccgggatggggcaccaatgccttcaggcggtaaaccaatttagg
aagacgtggcgggttttggcgggtcctcctcttcggcgtgtccgcagttttaaaaaacgtgtgtatgataaggaatcactgtctacattagtaattcccaactgggt
cggaaagtgaactttgctgaaggcgaagttagtaaccgcttcagttgctgaaggcagggtccagacttcggggtgaggaggattaactgaaggaccccgagggaac
cgggtgcgcagtaattgactcttgggcagacaggcgggtcgggtgctgtatctataaagacagcggggtctctctgaggcggggcaggggggaggttgccattgact
ggggagggaagagcgatcGCTGGTAACAGCCATTGTG CCTTC

ID del gen: NYFC (SEQ ID N°: 4)

GTGCTGATGTGAGATTTATTGAAACTGGatttgaaaacaattttcctgaattcaagtcgagggtttactccactattctcaattactttatcaccagggt
tataaacccaaaggaagtgtagtaaacacagtggtgattttatgaggacccatgcaacacatagctctcagaagggtccagtgctcattgttaaattcaaggttaccatca
gcagaggcagtcattctctctgcgtgttactaatgcactaactctcactgtaggaattccattcaagacacattgatgactatacctacagggtttgaagttattcgg
atggcggttttgacacttactagctgtgggacttagatcaagttacttaaccttttgagcttcagttttatcattgtaaaatggatacaatcctgatgcctttggaccaagtggt
tcaggaaatgaagagactaagtatgaaaaaacctatgctcatagtgctgtgtttccaactcgtgtataaaaactttaaaactctgattcaaaaataagaacaactatgt
cgactgaaggttacaagactaaattcttggtaagtactgtcttattctagagacatcacattacagtttggtgtctaagtctctttatgaattaaagtgccagactgtg
ctacttgaacggcatgcttaacttggaaacgccatgtgcacctcatccccagttcttttccccaaattaaaaacacaaatacacacacacgcccctacttagttcctaa
aactcaagggcgacgcgcacacactacttatttctaaaattcaagctcgcaccaaggagatccacaaggataggcagggtggtgtgaggtcactgggcagcgct
ccggtatccccgaagggggcggggtcaaaactcagatctcgagctccggaaggggcggggttaaaactctcagatctattccgctcctctgtctgctgcc
cttcccaattctcgcgagacctcaaggagcacagcttctgcgcaccgcacgatactgggagtcaggcgccaagggagggggaagggaaaaggggaaacggt
gcaaacggcggtggcgccatcttctgtgccccctctgcgcgcgtccgttctcgtgacgcacacttccccctccccctcgccgcgctgggctctgcattgcc
gactcgtaggagcgcggggcgctcgtctgtcttctgtgactcctcagcagaggtgtgtgagtgctgcggagtttctgtgcgagggtgatagggaagcgcgcg
gggggagggggcgagcgtcttcCGCCTTCGCCAGAGACCTC ACTTC

ID del gen: CHOP (SEQ ID N°: 5)

CTTTTGGGAGATtTACGGGGCTAGAACAGGAGACCACCCcggttttttgtttgtttgtttgtttgtttgttgaacgtagtctgctctgtcacc
caggctggagtgagtggcgcgatctcggctactgcaacatccgcctccagggttcaagcgattctctgctctgctccagagtagctgggattacaggcgcgcat
caccacaccgggctaattttgtatttttagtagagacggggttcacatgttggctcaggctgatctcgaactcctgacctcaagtgatccgctctcctcagctcccaaa
gtgctgggattacaggcgtaagccactgagcccgccaggagacctttaaagaagactcgagatgtcgacaatccagtggaatggataccaactttaaaagaa
aagtcaaaaaggcctatgtgccattagctgggaggggccaagaaatatgggagtcctttagtgggggtaaaacgcggggtaaagctagggtggcggaacag
cagcttctggggagacaagcggcaaaagggtcacgacccgactagggcgaccaaaggctgatagccgttggggccgttggcgccgggagctggcgccccg
ccctctctctctccccaccctccgcacctccaccaccctcgggtgtcccctgcgctgcgctgcagacaccggttgccaaacattgcatcatccccgcccccttc
ctccccccccccgctacactccccctcgcgcgcgcgcgatgactaccccactctcctggaagcctcgtgacccaaagccacttcgggtccgacactacgtcg
accctctagcgagagggagcgacggggcggtgcccggggctcctgtagtggcggaatgcgagggacggggcggggccaatgcggcgctgcacattctgattg
gtaggttttgggtccgcgccctgagaggaagggaaggccatggttaaagattacagccaggcgctcCCGAGGTCAGAGACTTAAGTCTAAGgc
aCTGAGCGTATC

ID del gen: locus 38A (SEQ ID N°: 6)

TAATAACAACATATCTGAAAAAGACGCTttaaattcccatttatgaaagcataaaaaatagttagaataaaatttaaccataaagggtgaaatatttgtata
ccgataactataaaccttggataaaaaaagttgaagaagAcacatatataatagaataatattctgtgttcattgaatcaaaaaatttaacaatgttaaaatgtctgtattaa
ccaaagcaatatacaaaattcaatgcaatttctatcaaaaattcaaggatgcatcacagaaatagaaaaaaattcttgaaattcatatggaaccacagacacataa
aaacagaataggcaaaggaacaatgagaaagcaaaacaaagcttgaggcatcacacttctaagttaaattataattgcaaggtacagtaatacaaaaacagtat
acaaattggcatgaaaacgaaaatgtggaccaacggaacagaatatagagagccagaaacttaactaaTTTTcaacaagGGTACCAACAGGACAC
CCTGGA

ID del gen: locus J7A (SEQ ID N°: 7)

ATTTCCACCAGCAACACACAAGGGTTCAGTTTCTCCACATCTTCACCAACACTTGTGGTTTTGCTTTTTGGTAAT
AGCCATGCTAATGGGTGTGAACAAGAAGTGCTTTAAGCATCTCCTAAAGCGGAAGAACTGAGGCCAGAGAAG
GGAAGAATCACACGAGAGATTGAGGTCACAAGCAAGTCAGTGATAGAGCAGGACCTGGAAGCTGGATCCCTA
ACCCCAGCCTAGTTCTTGCTACTAAACCCAAAAATCCAGTTTCCATTGCTATATGTCAGAGGGTGCACAGCCATG
GCCACAGGCCAGATACAGACTTTAAGTTTTATTTGGTTTATCTTCTCTTCTTTTTTAAATTCAAATAGTATCA
ACATTTAAAAAATFAGGGGATTTTATATTTTAAAAAGTCAAAATTTCTGATTTCTCCCCTCAAAAAATCAGAAGGTCTGG
TAACCCCTTGACCCACATTCTAACTCAGCAACCAACTATTACTGTCTTTTGTGGTTTGTCTGTTGAGACAAGGT
CTTGTCTGTCAACCAGGCTGGAGTACGGTGGCGTGATCACGGCTCACTGCAGTCTTGAACCTCTGGGCTCAAG
CAAGCCCCCGTCTTGGCCTCCCAAAGCTCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACGCCAGCCCTATCATTCTGTA
ATATCCTTCCACACAGGCTAGTTTCACACACTGGCTGGTCTGGTAACACTGGAGTTTGCAGCCCTTTGCTTTTCA
CATCCATAGATATTCCTCATTCTGAGTGTCAGTAGACAC AT AGTT ACGT GT AAC AT CAT AGGC AGGTT CC
AT ACTT CTTT CCTCTTTCTTTT A CTCT AT ATT GTCTTT G AAT AT CTT AGCT ATTT CCT C ACC AT AAAAGT
G AAAT AA T GTT GC AAAT AAAT AGT GC AAAAT ATT A AC A AAG AC AC AATT G AAT AGCCT G

El término “promotor” se refiere a una secuencia de nucleótidos, habitualmente corriente arriba (5') con respecto a su secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante al proporcionar reconocimiento de la ARN polimerasa y otros factores necesarios para una transcripción apropiada. Un “promotor” incluye un promotor mínimo que es una secuencia de ADN corta compuesta por un motivo TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción, al cual se agregan elementos reguladores para el control de la expresión. Un “promotor” también se refiere a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores que pueden controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo

de secuencia promotora consiste en elementos proximales y más dístales hacia el extremo 5', y estos últimos elementos a menudo se conocen como potenciadores. Por lo tanto, un "potenciador" es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad promotora y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o la especificidad tisular de un promotor. Puede funcionar en ambas orientaciones (normal o invertida), y puede funcionar aún cuando se lo mueve ya sea corriente arriba o corriente abajo con respecto al promotor. Tanto los potenciadores como otros elementos promotores corriente arriba se unen a proteínas de unión a ADN específicas de la secuencia que intervienen en sus efectos. Los promotores pueden derivar por completo de un gen nativo o pueden estar compuestos por elementos diferentes derivados de distintos promotores presentes en la naturaleza, o incluso pueden comprender segmentos de ADN sintético. Un promotor también puede contener secuencias de ADN involucradas en la unión de factores proteicos que controlan la eficacia del inicio de la transcripción como respuesta a condiciones fisiológicas o del desarrollo.

Según se usa en la presente, el término "biológicamente activo" significa que el promotor tiene por lo menos aproximadamente 0,1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 85%, aún 90% o más, por ejemplo 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la actividad del promotor CCT que comprende la SEQ ID N°: 1 o la SEQ ID N°: 2. La actividad de un promotor se puede determinar mediante métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, véase Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989). Los promotores de la presente divulgación que no son idénticos a la SEQ ID N°: 1 o la SEQ ID N°: 2, pero que retienen una actividad biológica comparable, se denominan variantes de promotores. Las secuencias de nucleótidos de la divulgación incluyen tanto secuencias naturales como las formas recombinantes.

La divulgación abarca composiciones de ácidos nucleicos aislados o sustancialmente purificados. En el contexto de la presente divulgación, una molécula de ADN o una molécula de ARN "aislada" o "purificada" es una molécula de ADN o una molécula de ARN que está separada de su entorno nativo y por ende no es un producto de la naturaleza. Una molécula de ADN o una molécula de ARN aislada puede existir en una forma purificada o puede encontrarse en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula huésped transgénica. Por ejemplo, una molécula de ácidos nucleicos "aislada" o "purificada", o una porción de la misma con actividad biológica, está sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo, cuando se la produce de acuerdo con técnicas recombinantes, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas, cuando se la sintetiza por medios químicos. En una forma de realización, un ácido nucleico "aislado" está libre de las secuencias que lo rodean en su entorno natural (es decir, las secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias formas de realización, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que rodean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que deriva el ácido nucleico. Los fragmentos y las variantes de las secuencias de nucleótidos divulgadas también están incluidas en la presente invención. Un "fragmento" o una "porción" se refieren a la longitud completa o menos de la longitud completa de la secuencia de nucleótidos.

El término "ácido nucleico" se refiere a un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN) y polímeros de los mismos, ya sea de hebra simple o doble, compuesto por monómeros (nucleótidos) que contienen un azúcar, fosfato y una base que puede ser una purina o pirimidina. A menos que se lo limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de los nucleótidos naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que son metabolizados de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca variantes modificadas de manera conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden efectuar generando secuencias donde la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o la totalidad de los codones) se sustituye por bases mixtas y/o por residuos de desoxiinosina. Un "fragmento de ácido nucleico" es una porción de una molécula de ácido nucleico dada.

Los términos "natural", "nativo" o "de tipo salvaje" se usan para describir un objeto que se puede encontrar en la naturaleza, a diferencia de ser producido artificialmente. Por ejemplo, una secuencia proteica o de nucleótidos presente en un organismo (inclusive en un virus), que puede ser aislada de una fuente natural y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio, es una secuencia natural.

Vectores y casetes de expresión

Se divulgan vectores y casetes de expresión que contienen a los promotores que se describieron precedentemente.

Vectores

Un "vector" incluye, entre otros, cualquier vector viral, así como cualquier vector de plásmidos, cósmidos, fagos o binarios con forma de hebra doble o simple, lineal o circular, que puede ser, o no, capaz de transmitirse o movilizarse a sí mismo, y que puede transformar un huésped procariota o eucariota ya sea por integración en el genoma celular o bien puede existir en una forma extracromosómica (por ejemplo, un plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación).

La selección y optimización de un vector de expresión particular para expresar una composición terapéutica específica (por ejemplo, una proteína) en una célula se pueden llevar a cabo mediante los pasos de obtener la secuencia de ácidos nucleicos que codifica a la proteína, posiblemente con una o más regiones de control apropiadas (por ejemplo, una secuencia promotora, de inserción); preparar una construcción de un vector que comprende al vector en el cual se insertará la secuencia de ácidos nucleicos que codifica a la proteína; transfectar o transducir células cultivadas in vitro con la construcción del vector; y determinar si la proteína está presente en las células cultivadas.

Los vectores para una terapia génica con células incluyen virus, tales como virus de replicación deficiente. Los retrovirus de replicación deficiente pueden dirigir la síntesis de todas las proteínas del virión, pero no pueden producir partículas infecciosas. Por lo tanto, estos vectores de expresión retrovirales alterados genéticamente son de utilidad general para una transducción altamente eficaz de secuencias de ácidos nucleicos en células cultivadas, y de utilidad específica en el método de la presente divulgación. Dichos retrovirus también son de utilidad para una transducción eficiente de secuencias de ácidos nucleicos en células in vivo. Los retrovirus se han usado extensivamente para transferir material de ácido nucleico a células. Los protocolos para producir retrovirus de replicación deficiente (que incluyen los pasos de incorporar un material de ácidos nucleicos exógeno en un plásmido, transfectar una línea celular de empaquetamiento con el plásmido, producir retrovirus recombinantes con la línea celular de empaquetamiento, recolectar partículas virales del medio de cultivo tisular e infectar las células blanco con las partículas virales) son bien conocidos en el arte.

Una ventaja de usar retrovirus en una terapia génica es que los virus insertan la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína blanco en el genoma de la célula huésped, lo cual permite que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína blanco pase a la progenie de la célula cuando se divide. Las secuencias promotoras en la región LTR pueden mejorar la expresión de una secuencia codificante insertada en una variedad de tipos celulares.

Otro candidato viral de utilidad como un vector de expresión para la transformación de células es un adenovirus (Ad), que es un virus a ADN de hebra doble. El adenovirus es infectivo en un amplio rango de tipos celulares que incluyen, por ejemplo, células musculares y endoteliales. Los adenovirus son virus a ADN de hebra doble lineal con un genoma de 36 kb. Los adenovirus tienen varias características que las vuelven muy útiles como vehículos de administración de transgenes para aplicaciones terapéuticas, tal como facilitar la administración de genes in vivo. Se ha demostrado que los vectores de adenovirus recombinantes pueden ser eficaces en la transferencia de genes in situ a células parénquimáticas de varios órganos, que incluyen pulmón, cerebro, páncreas, vesícula biliar e hígado. Esto ha permitido usar estos vectores en métodos de tratamiento de enfermedades genéticas heredadas, tal como la fibrosis quística, donde los vectores pueden administrarse en el órgano blanco.

Al igual que los retrovirus, el genoma del adenovirus se puede adaptar al uso como un vector de expresión en terapias génicas, es decir, mediante eliminación de la información genética que controla la producción del propio virus. Dado que el adenovirus funciona de una manera extracromosómica, el adenovirus recombinante no presenta el problema teórico de una mutagénesis de inserción.

Tradicionalmente se han utilizado varios enfoques para generar los adenovirus recombinantes. Un enfoque involucra la ligación directa de fragmentos de endonucleasas de restricción que contienen una secuencia de ácidos nucleicos de interés con porciones del genoma adenoviral. Como alternativa, se puede insertar la secuencia de ácidos nucleicos de interés en un adenovirus defectuoso mediante recombinación de homólogos. Los recombinantes deseados se identifican mediante examen de las placas individuales generadas en una capa de células de complementación.

Los ejemplos de vectores apropiados incluyen virus a ADN (por ejemplo, adenovirus), virus lentivirales, virales adenoasociados (AAV), poliovirus, HSV o vectores virales basados en Moloney de murino, vectores virales derivados del virus del sarcoma de Harvey, virus del sarcoma de ROUS, MPSV o vectores basados en transposones híbridos. En una forma de realización, el vector es AAV. El AAV es un pequeño virus no patógeno que pertenece a la familia Parvoviridae. El AAV es distinto de los otros miembros de esta familia debido a su dependencia de un virus ayudante para su replicación. El genoma de aproximadamente 5 kb del AAV consiste en un segmento de ADN de hebra simple de polaridad ya sea más o menos. Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas que se pueden plegar como estructuras en horquilla y sirven como origen de la replicación del ADN viral. Físicamente, el virión del parvovirus no tiene envoltura y su cápside icosaédrica es de aproximadamente 20 nm de diámetro.

Hasta la fecha, se han identificado muchos AAV serológicamente distintos y se han aislado de humanos o primates. Por ejemplo, el genoma del AAV2 es de 4680 nucleótidos de longitud y contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF izquierdo codifica las proteínas Rep no estructurales, Rep 40, Rep 52, Rep 68 y Rep 78, que están involucrados en la regulación de la replicación y transcripción además de la producción de genomas de progenie de hebra simple. También se ha demostrado que Rep68/78 tiene actividad de unión a NTP así como actividades ADN y ARN helicasa. Las proteínas Rep tienen una señal de localización nuclear, así como varios sitios potenciales de fosforilación. Una mutación de uno de estos sitios quinasa dio como resultado la pérdida de la actividad de

replicación.

Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas (ITR) que tienen la posibilidad de plegarse como estructuras en horquilla con forma de T que sirven como origen de la replicación del ADN viral. Se han descrito dos elementos dentro de la región ITR que son fundamentales para la función de la ITR, un motivo de repetición GAGC y el sitio de resolución terminal (trs). Se ha demostrado que el motivo de repetición se une a Rep cuando la ITR se encuentra en una conformación ya sea lineal o en horquilla. Esta unión sirve para posicionar a Rep68/78 para el corte en el trs que tiene lugar de una manera específica del sitio y de la hebra. Los vectores de AAV ofrecen varias características que los convierten en vectores atractivos para la transferencia de genes, tal como el hecho de presentar un amplio rango de huéspedes, la capacidad para transducir tanto en células en división como en células que no están en división in vitro e in vivo, y la capacidad para mantener altos niveles de expresión de genes transducidos.

En determinadas formas de realización, el vector viral es un vector de AAV. Un vector "AAV" se refiere a un virus adenoasociado y se puede referir al propio virus de tipo salvaje natural o a derivados del mismo. El término abarca todos los subtipos, serotipos y pseudotipos, y formas tanto naturales como recombinantes, excepto cuando se requiera lo contrario. Según se usa en la presente, el término "serotipo" se refiere a un AAV que se identifica y distingue de otros AAV basado en la reactividad de la proteína de la cápside con antisueros definidos; por ejemplo, hay ocho serotipos conocidos de los AAV de primate, los AAV1 a AAV8. Por ejemplo, el serotipo AAV9 se usa para hacer referencia a un AAV que contiene proteínas de la cápside codificadas por el gen cap del AAV9 y un genoma que contiene secuencias ITR 5' y 3' del mismo serotipo de AAV9. En determinadas formas de realización, el vector AAV es AAV9.

La abreviatura "AAVr" se refiere a un virus adenoasociado recombinante, también conocido como vector de AAV recombinante (o "vector AAVr"). En una forma de realización, los vectores de expresión AAV se construyen usando técnicas conocidas para al menos comprender, como componentes ligados operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionarán para que sean funcionales en una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene a los componentes ligados operativamente está flanqueada (5' y 3') por secuencias ITR AAV funcionales.

Por "repeticiones terminales invertidas del virus adenoasociado" o "ITR AAV" se entienden las regiones conocidas en el arte que se encuentran en cada extremo del genoma del AAV que funcionan juntas en cis como orígenes de la replicación de ADN y como señales de empaquetamiento para el virus.

Las secuencias de nucleótidos de las regiones ITR AAV son conocidas. Según se usa en la presente, no es necesario que una "ITR AAV" comprenda la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje representada, sino que puede estar alterada, por ejemplo, mediante la inserción, supresión o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, las ITR AAV pueden derivar de cualquiera entre varios serotipos de AAV que incluyen, en un sentido no taxativo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Aún más, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de AAV no son necesariamente idénticas ni derivan del mismo serotipo o forma aislada de AAV, siempre que tengan la función pretendida, es decir, que permitan cortar y rescatar la secuencia de interés del genoma de una célula huésped o de un vector.

Los ácidos nucleicos codificantes en las composiciones terapéuticas se pueden manipular genéticamente en un vector de AAV usando técnicas de ligación estándar, tales como las que se describen en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY (2001). Por ejemplo, las ligaciones se pueden llevar a cabo en Tris-Cl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, BSA 33 µg/ml, NaCl 10 mM-50 mM y ya sea ATP 40 µM, 0,01-0,02 unidades (Weiss) de T4 ADN ligasa a 0 °C (para una ligación de "extremos adhesivos") o bien, ATP 1 mM, 0,3-0,6 unidades (Weiss) de T4 ADN ligasa a 14 °C (para una ligación de "extremos romos"). Las ligaciones intermoleculares de "extremos adhesivos" habitualmente se efectúan a concentraciones de 30-100 µg/ml de ADN total (concentración total final de 5-100 nM). Los vectores AAV que contienen ITR se han descrito, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. N°: 5.139.941. En particular, en dicha publicación se describen varios vectores AAV que están disponibles en la *American Type Culture Collection* ("ATCC") con los N° de Acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226.

En determinadas formas de realización, el virus adenoasociado empaqueta un genoma de longitud completa, es decir, un genoma que es aproximadamente del mismo tamaño que el genoma nativo, y que no es demasiado grande ni demasiado pequeño. En determinadas formas de realización, el AAV no es un vector de AAV autocomplementario.

El vector viral incluye además un promotor para controlar la transcripción del gen heterólogo. El promotor puede ser un promotor inducible para controlar la transcripción de la composición terapéutica. El sistema de expresión es adecuado para su administración al receptor de mamífero.

En determinadas formas de realización, se administran partículas virales. Las partículas virales son estables al calor, resistentes a solventes, detergentes, cambios en el pH, temperatura y se pueden concentrar sobre gradientes de

CsCl. El AAV no está asociado con ningún evento patógeno, y no se ha observado que la transducción con vectores de AAV pudiera inducir ningún efecto negativo duradero sobre el crecimiento o la diferenciación celular. Se ha demostrado que las ITR son los únicos elementos en cis necesarios para el empaquetamiento, que permite un vaciado completo de los genes virales a fin de crear sistemas de vectores.

En determinadas formas de realización, se divulga un vector que contiene un casete de expresión que comprende un promotor ligado operativamente a una secuencia blanco. Un "casete de expresión", según se usa en la presente, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular, en una célula huésped apropiada, que incluye un promotor ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que puede estar ligado operativamente a señales de terminación. La región codificante habitualmente codifica un ARN de interés funcional, por ejemplo, una molécula de ARNi. El casete de expresión que incluye la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico.

Determinadas formas de realización de la presente divulgación proveen un vector que codifica una molécula blanco, tal como una molécula de ARNi aislada. Según se usa en la presente, el término "codificado por" se utilizad en un sentido amplio, similar al término "que comprende" en la terminología de patentes. Las moléculas de ARNi incluyen ARNpi, ARNhc y otros ARN pequeños que pueden o que tienen la capacidad para modular la expresión de un gen blanco, por ejemplo, por medio de interferencia de ARN. Dichos ARN pequeños incluyen, en un sentido no taxativo, ARNhc y microARN (miARN).

"Ligado operativamente" hace referencia a la asociación de secuencias de ácidos nucleicos en un solo fragmento de ácidos nucleicos, de manera tal que la función de una de las secuencias es afectada por la otra. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ADN reguladora está "ligada operativamente a" o "asociada con" una secuencia de ADN que codifica un ARN o un polipéptido si las dos secuencias están ubicadas de manera tal que la secuencia de ADN reguladora afecta la expresión de la secuencia de ADN codificante (es decir, que la secuencia codificante o ARN funcional se encuentra bajo el control de transcripción del promotor). Las secuencias codificantes pueden estar ligadas operativamente a secuencias reguladoras, con una orientación en el sentido del marco de lectura o antisentido. Un ácido nucleico está ligado operativamente cuando se encuentra en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. En general, el término "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están siendo ligadas sean contiguas. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. La unión se logra mediante enlaces en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Adicionalmente, se pueden unir múltiples copias del ácido nucleico que codifica las enzimas en el vector de expresión. Dichos múltiples ácidos nucleicos pueden estar separados por conectores.

"Expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de un gen endógeno o de un transgen en las células. Por ejemplo, en el caso de las construcciones antisentido, la expresión puede definir la transcripción del ADN antisentido solamente. Además, la expresión se refiere a la transcripción y acumulación estable de un ARN sentido (ARNm) o funcional. La expresión también puede hacer referencia a la producción de proteínas.

"Casete de expresión", según se usa en la presente, se refiere a una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular, en una célula huésped apropiada, que comprende un promotor ligado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que puede estar ligado operativamente a señales de terminación. Típicamente también comprende las secuencias necesarias para una traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos. La región codificante habitualmente codifica una proteína de interés, pero también puede codificar un ARN funcional de interés, por ejemplo, un ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés es quimérico, lo cual significa que por lo menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a por lo menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser aquel que es natural pero que se ha obtenido de una manera recombinante que es de utilidad para una expresión heteróloga. Dichos casetes de expresión comprenderán la región de inicio de la transcripción ligada a una secuencia de nucleótidos de interés. Este casete de expresión se puede proveer con una pluralidad de sitios de restricción para insertar el gen de interés bajo la regulación de la transcripción de regiones reguladoras. El casete de expresión puede contener además genes marcadores seleccionables.

La presente divulgación también provee una célula de mamífero que contiene un vector descrito en la presente. La célula puede ser humana, y puede ser de cerebro, bazo, riñón, pulmón, corazón o hígado. El tipo de célula puede comprender una población de células madre o progenitoras.

Ácidos nucleicos que codifican una composición terapéutica

Se divulga un método de administración de una composición terapéutica. En determinadas formas de realización, la composición terapéutica es un transgen, que es un gen que codifica un polipéptido que es extraño para el retrovirus del cual el vector deriva primariamente y tiene una actividad biológica útil en el organismo al cual es administrado (por ejemplo, un gen terapéutico). Según se usa en la presente, el término "gen terapéutico" se refiere a un gen cuya expresión resulta deseable en una célula para proporcionar un efecto terapéutico, por ejemplo, para tratar una

enfermedad.

Métodos de uso

La presente divulgación provee un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, tal como una enfermedad genética, tal como la enfermedad de Huntington, ALS, hemiplejía espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Alzheimer, una enfermedad por repeticiones de poliglutamina, exposición focalizada tal como la enfermedad de Parkinson, mediante la administración de un vector que contiene a los promotores aislados que se describieron precedentemente.

Determinados aspectos de la divulgación se relacionan con polinucleótidos, polipéptidos, vectores y células modificadas genéticamente (modificadas *in vivo*), y el uso de los mismos. En particular, la divulgación se relaciona con un método para una terapia génica o con proteínas que permita una administración sistémica de una dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico.

A continuación, la invención se ilustrará en el siguiente Ejemplo no limitativo.

Ejemplo 1

Para este experimento, se utilizó tejido de cerebro humano *post mortem* obtenido de 6 pacientes diferentes con enfermedad de Huntington o de 5 individuos sanos control para analizar la actividad de los 5 promotores diferentes de polimerasa 2. Se extrajo el ARN y luego se lo sometió a una PCR cuantitativa a fin de medir la cantidad de transcripto de ARN endógeno producido por estos promotores. Los autores encontraron un aumento significativo de la expresión con los cinco promotores en cerebros de pacientes con enfermedad de Huntington en comparación con los individuos sanos. **Figura 1.**

Se sacrificaron ratones de tipo salvaje (WT) y HD a las 6 y 11 semanas (presintomáticos) y a las 19 semanas (sintomáticos) de vida. Se aisló ARN total de muestras del cuerpo estriado y se determinó la expresión de los genes Nfyc, H2afy, Usp31 y Chop de ratón usando una Q-PCR de tiempo real. A las 6 y 11 semanas de vida, no había aumentado la expresión de ninguno de los genes, en tanto a las 19 semanas de vida había aumentado significativamente la expresión de Nfyc y H2afy. Se evaluaron 4 ratones por grupo. **Figuras 2A-2C.**

Se clonó cada una de las secuencias genéticas promotoras corriente arriba con respecto a un gen informante que codifica la luciferasa de luciérnaga. Estas construcciones fueron expresadas transitoriamente células humanas cultivadas con el fin de validar su actividad de transcripción en condiciones basales. **Figura 3.**

Las construcciones promotoras que se muestran en el Anexo 4 fueron transfectadas transitoriamente en fibroblastos cultivados derivados de individuos control o enfermedad de Huntington. Los autores observaron una actividad aumentada de las secuencias genéticas promotoras clonadas en fibroblastos de enfermedad de Huntington en comparación con fibroblastos control. **Figura 4.**

El uso de los términos “un” y “una” y “el”, “la”, “los” y “las” y de referentes similares en el contexto de descripción de la invención se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o se encuentre claramente contraindicado por el contexto. Los términos “comprende”, “tiene”, “incluye” y “contiene” no se deben interpretar como términos indefinidos (es decir, significa “incluye, pero no se limita a”) salvo que se indique de otra manera. La indicación de los rangos de valores en la presente sirve meramente como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique de otra manera en la presente, y cada valor separado se incorpora en la Descripción como si estuviera indicado individualmente en la presente. Todos los métodos que se describen en la presente se pueden realizar en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o bien que el contexto lo contraindique claramente. El uso de cualesquiera y de todos los ejemplos o el lenguaje ejemplificativo (por ejemplo, “tal como”) que se proporciona en la presente, tiene simplemente la intención de iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a no ser que se reivindique de otra manera. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar como que indique que algún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

En la presente se describen las formas de realización de esta invención, inclusive las mejores prácticas conocidas por los inventores para llevar a cabo la misma. Las variaciones de estas formas de realización serán evidentes para los especialistas en el arte con la lectura de la descripción precedente.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia promotora aislada que comprende un ácido nucleico de entre 500 y 1700 nucleótidos de longitud que tiene por lo menos un 98% de identidad con la SEQ ID N°: 1, la SEQ ID N°: 2 o la SEQ ID N°: 7.
2. La secuencia promotora aislada de la reivindicación 1, en donde la secuencia promotora consiste en el ácido nucleico de entre 500 y 1700 nucleótidos de longitud que tiene por lo menos 98% de identidad con la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 7.
3. La secuencia promotora aislada de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido nucleico presenta por lo menos 99% de identidad con la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 7.
4. La secuencia promotora aislada de la reivindicación 3, en donde el ácido nucleico presenta un 100% de identidad con la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 7.
5. La secuencia promotora aislada de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico es de entre 1500 y 1700 nucleótidos de longitud y tiene por lo menos un 98% de identidad con la SEQ ID N°: 1, el ácido nucleico es de entre 600 y 800 nucleótidos de longitud y tiene por lo menos un 98% de identidad con la SEQ ID N°: 2 o el ácido nucleico es de entre 900 y 1700 nucleótidos de longitud y tiene por lo menos 98% de identidad con la SEQ ID N°: 7.
6. Un casete de expresión que comprende la secuencia promotora de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que es funcional en una célula transformada ligado operativamente a un segmento de ADN preseleccionado que codifica una proteína o un transcrito de ARN.
7. El casete de expresión de la reivindicación 6, en donde el segmento de ADN preseleccionado comprende un gen marcador seleccionable o un gen informante, o en donde el segmento de ADN preseleccionado codifica una composición terapéutica, preferiblemente una molécula de ARNi.
8. Un vector que comprende el casete de expresión de la reivindicación 6 o 7.
9. El vector de la reivindicación 8, en donde el vector es un vector de un virus adenoasociado (AAV).
10. Un método para producir células transformadas que comprende los pasos de (i) introducir en las células un ADN recombinante que comprende una secuencia promotora de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ligada operativamente a un segmento de ADN para de esa manera obtener células transformadas, y (ii) identificar o seleccionar una línea de células transformadas.
11. El método de la reivindicación 10, en donde la expresión del ADN recombinante es tal que imparte una característica fenotípica a las células transformadas o en donde las células transformadas presentan una expresión significativamente aumentada de un gen informante cuando es introducido en células derivadas de pacientes con la enfermedad de Huntington en comparación con células derivadas de individuos control.
12. Una célula transformada que comprende la secuencia promotora aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el casete de expresión de la reivindicación 6 o 7 o el vector de la reivindicación 8 o 9.
13. La célula transformada de la reivindicación 12, en donde la célula transformada comprende el casete de expresión de la reivindicación 6 o 7 o el vector de la reivindicación 8 o 9, y en donde la célula huésped es una célula eucariota.
14. La célula transformada de la reivindicación 13, en donde la célula eucariota es una célula de mamífero.
15. La célula transformada de la reivindicación 14, en donde dicha célula de mamífero es una célula humana.
16. El vector de la reivindicación 8 o 9 o la célula transformada de la reivindicación 12 para usar en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa en un mamífero.

Fig. 1

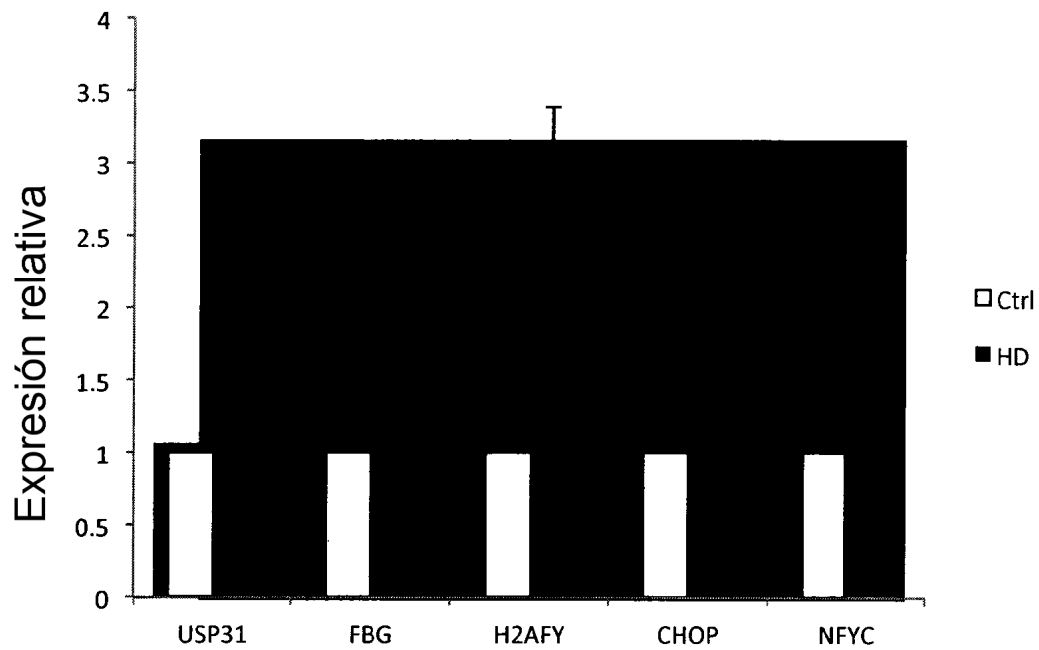


Fig. 2A

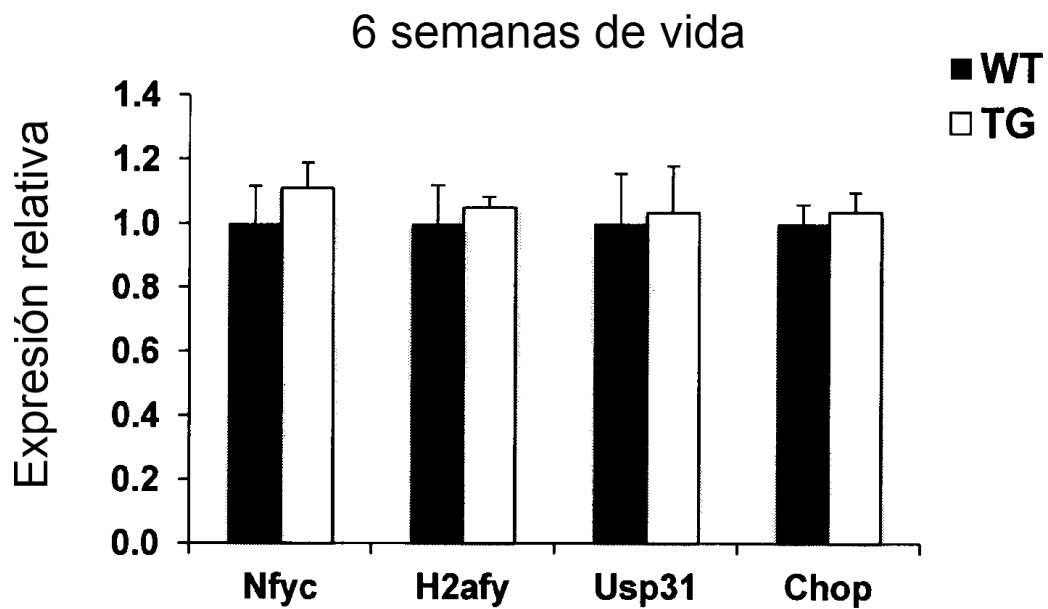


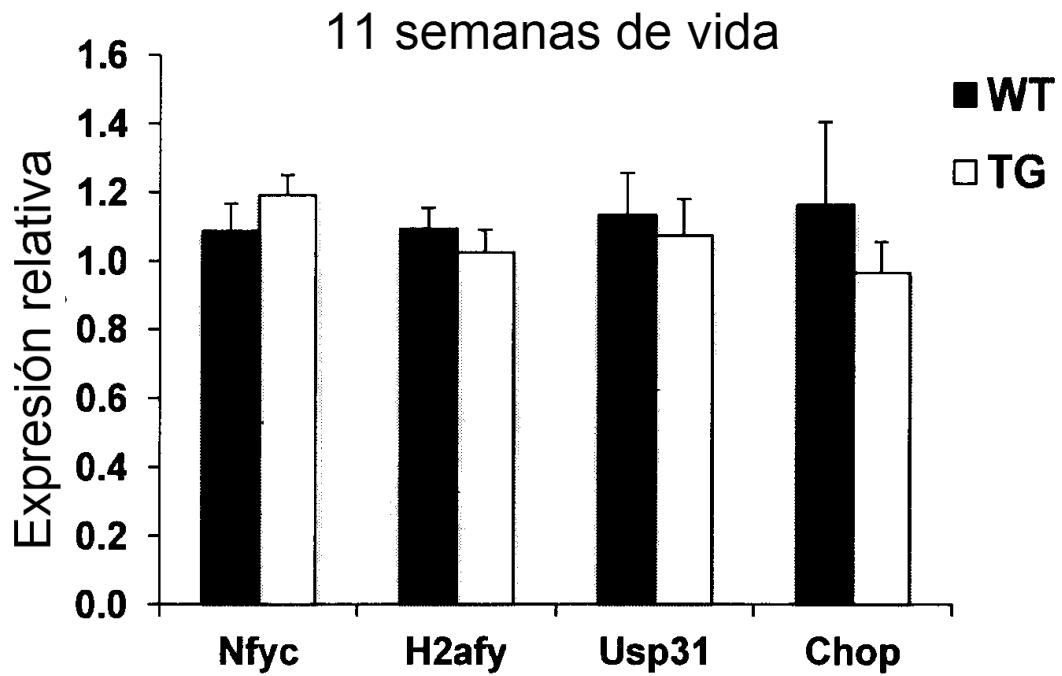
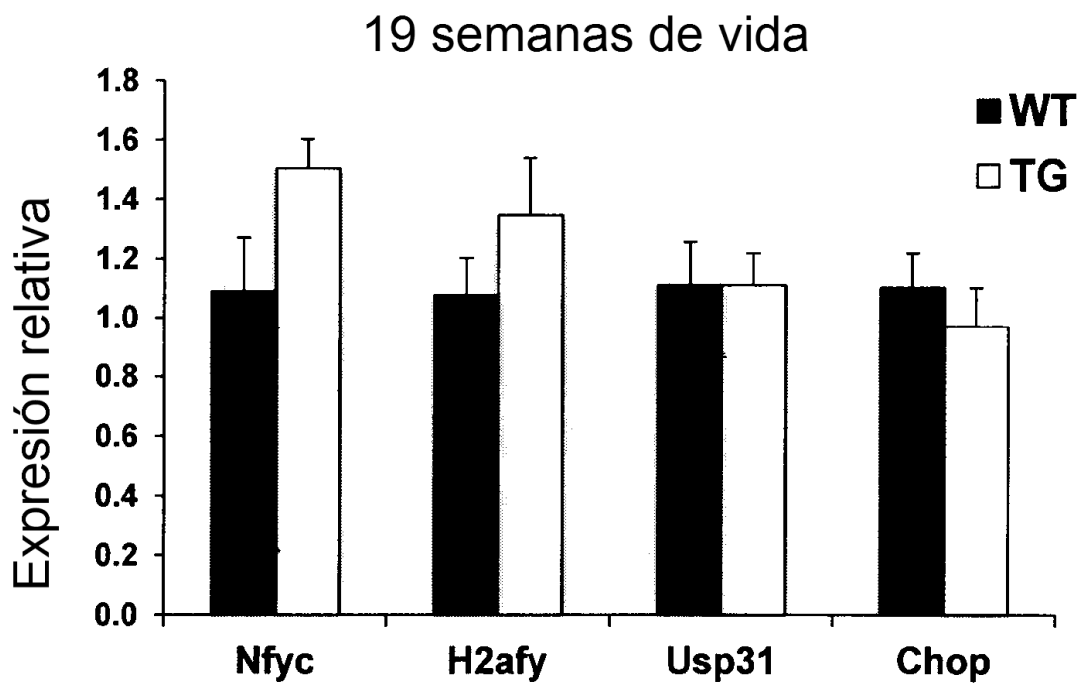
Fig. 2B**Fig. 2C**

Fig. 3

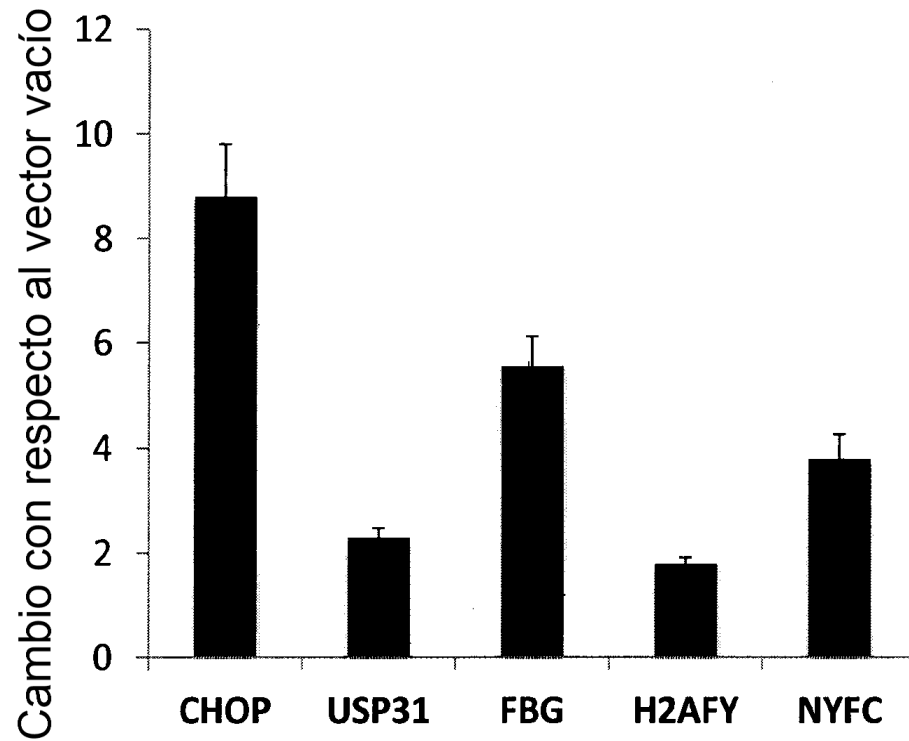


Fig. 4

