

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 867**

21 Número de solicitud: 202230352

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.04.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.11.2023

71 Solicitantes:

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (85.0%)
C/ Monforte de Lemos, nº 5 pabellón 6
28029 Madrid (Madrid) ES y
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED (15.0%)

72 Inventor/es:

ALONSO GARCÍA DE LA ROSA, Francisco
Javier;
CERVERA MAYOR, Saint Thomas y
MELERO FERNÁNDEZ DE MERA, Raquel María

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **ÁCIDO NUCLEICO Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DEL SARCOMA DE EWING**

57 Resumen:

Ácido nucleico y su uso en el tratamiento del sarcoma de Ewing.

La presente invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos aislada que comprende (i) una secuencia reguladora de la expresión específica de células de sarcoma de Ewing que comprende n repeticiones de la secuencia GGAA, y (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, en donde la secuencia (i) regula la expresión de la secuencia (ii), así como al vector, la célula, la nanopartícula y la composición que los comprenden. También se relaciona con el uso de dicha secuencia de nucleótidos y los aspectos derivados de ella en el tratamiento de Sarcoma de Ewing.

ES 2 954 867 A1

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico y su uso en el tratamiento del sarcoma de Ewing

5 La presente invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos aislada con capacidad de expresarse específicamente en células de Sarcoma de Ewing. Dicha secuencia de nucleótidos está formada por una secuencia reguladora y una secuencia que codifica para una proteína terapéutica capaz de inactivar la oncoproteína EWSR1-FLI1 o bien inducir la apoptosis de las células tumorales o bien evitar la proliferación
10 incontrolada de las mismas, proporcionando una nueva herramienta para el tratamiento del Sarcoma de Ewing.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El sarcoma de Ewing es un tumor muy agresivo que afecta a niños y adolescentes. La mayoría de los tumores se localizan en los huesos largos y tubulares como la tibia o el fémur, aunque un 10% de los tumores pueden también desarrollarse en tejidos blandos. Desde el punto de vista histológico, el sarcoma de Ewing está formado por células pequeñas, con escaso citoplasma y carentes de cualquier signo de diferenciación, por
20 lo que el diagnóstico diferencial frente a otras entidades de aspecto similar reviste cierta complejidad.

La principal característica molecular del sarcoma de Ewing es la presencia de traslocaciones cromosómicas específicas de este tumor. La translocación cromosómica
25 t(11:22)(q24;q12) es la más frecuente, presente en el 85% de los casos, en la que el gen EWSR1 (del inglés *Ewing sarcoma breakpoint region 1*) se fusiona al factor de transcripción génico FLI1 (del inglés *Friend leukemia integration 1*) y cuya expresión da lugar a la proteína de fusión EWSR1-FLI específica de las células de sarcoma de Ewing. Aunque esta es la más frecuente, también pueden darse fusiones entre el gen EWSR1
30 y otros miembros de la familia ETS, como son ERG, ETV1, ETV4 o FEV, que se detectan en el 15% de los sarcomas de Ewing restantes. Dichas fusiones dan lugar a proteínas quiméricas que actúan como nuevos factores de transcripción aberrantes que gobiernan la expresión de genes implicados en la regulación de la proliferación celular, produciendo un crecimiento descontrolado que da lugar al tumor.

35

En la actualidad el tratamiento convencional consta de tres fases: i) fase de inducción que consiste en la administración de ciclos de quimioterapia combinando 3-4 fármacos, ii) cirugía para extirpar el tumor residual y/o radioterapia cuando la extirpación total no es posible, y iii) fase de consolidación consistente en una nueva ronda de quimioterapia.

5 A pesar de estos tratamientos tan agresivos, una proporción muy importante de los pacientes muere a causa de la enfermedad, como consecuencia de tumores refractarios que no responden al tratamiento o a la aparición de recidivas tardías, la gran mayoría de las veces con resultados fatales. Todo ello indica que los tratamientos actuales han llegado a su techo y, en consecuencia, se hace imprescindible el desarrollo de nuevas
10 terapias más eficaces y específicas basadas en la biología molecular de estos tumores.

En vista de lo anterior, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar nuevos tratamientos alternativos a los ya existentes contra la enfermedad de sarcoma de Ewing que no presenten los inconvenientes de la quimioterapia y que permitan dar
15 respuesta a los pacientes en los que los tratamientos actuales no son eficaces.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una nueva herramienta terapéutica en el
20 tratamiento del sarcoma de Ewing que comprende expresar de forma específica en células de sarcoma de Ewing una proteína que es capaz de inactivar la oncoproteína EWSR1-FLI1, o bien provocar la muerte de dichas células o bien evitar que dichas células proliferen y den lugar a un tumor.

25 La nueva herramienta desarrollada por los inventores está basada en la presencia de regiones polimórficas ricas en repeticiones GGAA en las células de sarcoma de Ewing que actúan como secuencias reguladoras de la expresión y por las que la proteína quimérica EWSR1-FLI1 y el resto de fusiones características de estos tumores tienen afinidad, uniéndose a ellas y actuando como factores transcripcionales. Así, los
30 inventores han diseñado una construcción genética que comprende dicha secuencia reguladora de la expresión rica en secuencias GGAA para dirigir la expresión de una proteína interés de forma específica en células de sarcoma de Ewing, es decir, la proteína de interés se expresa exclusivamente en las células de sarcoma de Ewing que expresan EWSR1-FLI1 (o cualquiera de las fusiones características de estos tumores),
35 pero no en células que expresan el gen FLI1 nativo ni en células que no expresan FLI1.

De este modo, si esa proteína de interés es una proteína tóxica para la célula, o tiene la capacidad de evitar la expresión de, o bloquear, la proteína quimérica EWSR1-FLI1 (o cualquiera de las fusiones equivalentes), se estaría evitando el progreso del sarcoma de Ewing y con ello, promoviendo el tratamiento de dicha enfermedad. Un esquema de la invención se muestra en la figura 1.

Los inventores pusieron en práctica la invención arriba descrita empleando como proteína de interés una nucleasa, y expresando específicamente dicha nucleasa junto con un ARN guía (gARN) dirigido contra el exón 2 o el exón 9 del gen FLI1 en células de sarcoma de Ewing (ver Ejemplos 1 y 2). De este modo, se consiguió la inactivación genética de EWSR1-FLI1, y la reducción de la proliferación de las células del sarcoma de Ewing (ver Ejemplo 3 y la figura 5).

En resumen, esta invención va dirigida a una herramienta para expresar proteínas con potencial terapéutico de manera específica en las células de sarcoma de Ewing. La estrategia descrita en esta invención puede ser utilizada para expresar una nucleasa que en combinación con una guía RNA induzca la inactivación genética de EWSR1-FLI1, expresar una proteína tóxica para las células de sarcoma de Ewing o expresar una proteína inmunomoduladora. En definitiva, es posible, basada en esta invención, desarrollar un abordaje terapéutico eficaz para el tratamiento del sarcoma de Ewing, que podría ser de aplicación en todos los pacientes, pero particularmente en aquellos refractarios al tratamiento (aproximadamente un 25% de los casos) y para los que no existen en la actualidad alternativas terapéuticas eficaces.

En vista de lo anterior, en un aspecto la presente invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos aislada, de aquí en adelante "secuencia de nucleótidos de la invención", que comprende

- (i) una secuencia reguladora de la expresión génica donde dicha secuencia reguladora es específica de células de sarcoma de Ewing y comprende n repeticiones de la secuencia GGAA o (su complementaria) TTCC, en donde n es un número entero igual o mayor de 1; y
- (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, en donde la secuencia (i) regula la expresión de la secuencia (ii).

Las secuencias de (i) e (ii) indicadas arriba se encuentran operativamente unidas.

En la presente invención, se entiende que una secuencia de nucleótidos está aislada cuando dicha secuencia de nucleótidos no está en presencia de, o asociada a, otras secuencias que lo acompañan en su entorno natural.

5

En la presente invención se entiende por “secuencia reguladora de la expresión génica” las secuencias de nucleótidos encargadas de dirigir la transcripción de un gen (o genes) para que este se exprese. En general, entre las secuencias reguladoras de la transcripción se incluyen, sin limitarse a, secuencias promotoras, secuencias de iniciación y terminación de la transcripción, y secuencias potenciadoras o activadoras (también llamadas *enhancers*). Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la secuencia reguladora de la expresión génica es heteróloga a la secuencia que está siendo regulada (la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés). En la presente invención se entiende que dos secuencias son “heterólogas” una respecto a la otra cuando ambas secuencias no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Ejemplos de esta situación incluyen, sin limitar a, cuando las dos secuencias proceden de distintos organismos, o cuando la secuencia regulada (el gen) no es la secuencia regulada de forma natural por la secuencia reguladora (por ejemplo, el promotor).

20

La secuencia reguladora de la expresión génica de la presente invención es una secuencia de nucleótidos que es reconocida específicamente por las proteínas quiméricas EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4 y/o EWSR1-FEV y por tanto va a estar activa únicamente en las células que expresan estas proteínas quiméricas resultantes de la translocación cromosómica característica del sarcoma de Ewing. Además, dicha secuencia reguladora de la expresión génica específica de células de sarcoma de Ewing comprende n repeticiones de la secuencia GGAA o TTCC, en donde n es un número entero igual o mayor de 1. La presencia de estas repeticiones GGAA o TTCC en la secuencia reguladora hace que sean reconocidas específicamente por las proteínas quiméricas arriba citadas, y que al actuar éstas como factores de transcripción, desencadenen la transcripción del gen que está aguas abajo (*downstream*) de la secuencia reguladora. El número de repeticiones (n) de la secuencia GGAA o TTCC puede ser muy variable, desde 1 o 2 repeticiones hasta más de 1.000. Así, en una realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, n es un número entero de entre 2 y 1.000, ambos extremos incluidos.

35

Asimismo, cabe señalar que secuencias GGAA o TTCC degeneradas también son reconocidas específicamente por las proteínas quiméricas arriba citadas, por lo que la secuencia reguladora de la expresión puede estar caracterizada por n repeticiones de secuencias GGAA o TTCC degeneradas. Así, en otra realización particular de la

5 secuencia de nucleótidos de la invención, sola o en combinaciones con realizaciones particulares anteriores, la secuencia GGAA o TTCC es una secuencia GGAA o TTCC degenerada, preferiblemente, la secuencia GGAA degenerada es la secuencia GGGA, GGAG, GAGG, AGGG, GAAA, AGAA, AAGA o AAAG y la secuencia TTCC degenerada es la secuencia CCCT, CCTC, CTCC, TCCC, CTTT, TCTT, TTCT o TTTC.

10

En otra realización preferida, la secuencia reguladora de la expresión génica descrita en (i) comprende, más preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO: 1.

15

La secuencia reguladora de la expresión de la secuencia de nucleótidos de la invención puede comprender, además de la repetición de la secuencia GGAA (o de secuencias GGAA degeneradas) o TTCC (o secuencias TTCC degeneradas), un promotor, un potenciador y/o otra/s secuencia/s reguladoras. Así, en otra realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, la secuencia reguladora de la expresión génica además comprende:

20

(i) una secuencia promotora de un gen regulado positivamente en células de sarcoma de Ewing por la proteína quimérica EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4 o EWSR1-FEV, o un fragmento de dicho promotor,

25

(ii) una secuencia potenciadora de la expresión, o *enhancer*, de un gen regulado positivamente en células de sarcoma de Ewing por la proteína quimérica EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4 o EWSR1-FEV, o un fragmento de dicha secuencia potenciadora de la expresión, y/o

(iii) una secuencia reguladora, como por ejemplo una secuencia TATA, o una secuencia específica de otros factores de transcripción.

30

La secuencia GGAA o TTCC referida en la presente invención puede ser, pero sin limitarse:

35

(i) una secuencia de repeticiones GGAA o TTCC presente en el genoma humano o en cualquier otro genoma de células eucariotas o procariotas, con o sin relación con la expresión de un determinado gen, y/o

(ii) una secuencia de repeticiones GGAA o TTCC concatenadas no presentes en la

naturaleza, sino diseñadas específicamente para responder a los factores de transcripción EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4 o EWSR1-FEV.

5 En la presente invención el término “promotor” o “secuencia promotora” hace referencia a una secuencia de nucleótidos localizada en dirección 5’ del inicio transcripcional de un gen, e implicada en el reconocimiento y la unión de la ARN polimerasa y otras proteínas encargadas de la transcripción de un gen en dirección 3’. En general, el promotor será adecuado para la célula huésped en la que se expresa el gen de interés, el cual, en esta
10 invención, es una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés. En la presente invención se entiende que un fragmento de dicho promotor es un fragmento “funcionalmente equivalente” del promotor de un gen regulado positivamente en células de sarcoma de Ewing por la proteína quimérica EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4 o EWSR1-FEV, cuando dicho fragmento aún no teniendo una
15 secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia del promotor, retiene la misma función que el promotor con la secuencia de nucleótidos completa.

Existen gran cantidad de genes regulados positivamente en células de sarcoma de Ewing por las proteínas quiméricas resultantes de las translocaciones cromosómicas en
20 las células de sarcoma de Ewing, en particular, por las proteínas quiméricas EWSR1-FLI1 o EWSR1-ERG, y cualquiera de sus secuencias promotoras puede usarse en el contexto de la presente invención. Ejemplos de genes regulados por las proteínas quiméricas, en particular, por las proteínas EWSR1-FLI1 o EWSR1-ERG, incluyen, sin limitar a, NR0B1, FEZF1, NKX2.2, SOX6, FATE1, PAX7 o EGR2. No obstante, en una
25 realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, la secuencia promotora es el promotor del gen NR0B1, o un fragmento de dicho promotor funcionalmente equivalente.

El gen NR0B1 (de sus iniciales en inglés *nuclear receptor subfamily 0 group B member*
30 *1*), también conocido como AHC; AHX; DSS; GTD; HHG; AHCH; DAX1; DAX-1; NROB1; SRXY2 (NCBI; Gene ID: 190, actualizado el 25 de enero de 2022), presenta una secuencia de nucleótidos (NCBI *Reference Sequence*: NM_000475.5) que codifica una proteína (NCBI *Reference Sequence*: NP_000466.2) que comprende un dominio de unión al ADN y que actúa como un regulador de la transcripción dominante-negativo
35 que es mediado por el receptor ácido retinoico.

Alternativamente, o en combinación con la secuencia promotora, la secuencia reguladora de la expresión génica de la invención puede comprender una secuencia potenciadora o “*enhancer*” de un gen regulado positivamente en células de sarcoma de Ewing por las proteínas quiméricas resultantes de las translocaciones cromosómicas en las células de sarcoma de Ewing, en particular, por las proteínas quiméricas EWSR1-FLI1 o EWSR1-ERG, y cualquiera de sus secuencias potenciadoras puede usarse en el contexto de la presente invención. Ejemplos de estas secuencias potenciadoras incluyen, sin limitarse a, PRC1, PPP1R1A. Fragmentos funcionalmente equivalentes de dichas secuencias potenciadoras también pueden usarse en el contexto de la presente invención. El significado del término “fragmento funcionalmente equivalente” ha sido definido en párrafos anteriores.

Otro elemento de la secuencia de nucleótidos de la invención es una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés. En la presente invención se entiende por “proteína de interés” a aquella proteína que se quiere expresar de forma específica en células de sarcoma de Ewing y que, preferiblemente, cuando está presente en la célula, ejerce algún efecto terapéutico sobre el sarcoma de Ewing. Así, se consideran proteínas terapéuticas aquellas proteínas que, por ejemplo, (i) inducen la apoptosis de la célula en la que se expresan, (ii) evitan la expresión de la proteína quimérica, (iii) introducen mutaciones en la proteína quimérica que evitan que ésta sea funcional, (iv) cortan el ADN de manera secuencia-específica, como las nucleasas RNA-inducidas y nucleasas artificiales; (v) inducen una respuesta inmune dirigida contra las células de sarcoma de Ewing; etc. No obstante, como entiende el experto en la materia, también es posible emplear como proteína de interés proteínas fluorescentes (GFP, mCherry y similares); proteínas luciferasa y similares, etc. En una realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, sola o en combinación con las realizaciones particulares anteriores, la proteína de interés es una nucleasa o una proteína tóxica para las células.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “nucleasa” una enzima hidrolasa (EC 3.1.4) que cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster, como por ejemplo, los que se establecen en los ácidos nucleicos entre la pentosa de un nucleótido y el grupo fosfato de otro. A las nucleasas también se les conoce con el nombre de fosfodiesterasas (PDE). Las nucleasas pueden clasificarse según el tipo de ácido

nucleico que escinden (si el sustrato es el ARN se denominan ribonucleasas, y si es ADN se conocen como desoxirribonucleasas), o según la acción de la enzima (exonucleasa si empieza por los extremos de la cadena de ácido nucleico, o endonucleasa si la ruptura ocurre en un punto interior de la cadena). Ejemplos de nucleasas que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin
5 limitar a, nucleasas de dedos de cinc (ZFN) manipuladas, nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), o nucleasas del sistema CRISPR/Cas con un ARNcr manipulado/ARNtracr ('ARN guía monocatenario', 'secuencia guía', '*guide RNA*' o 'gRNA') para guiar la escisión específica. Además, están desarrollándose nucleasas
10 dirigidas basándose en el sistema Argonaute (por ejemplo, de *T. thermophilus*, conocido como 'TtAgo'), que también puede tener posibilidades de usos en la edición del genoma y genoterapia.

Así, en una realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, solo o
15 en combinación con el resto de realizaciones particulares antes descritas, la nucleasa es una nucleasa ARN-inducida o una nucleasa artificial.

Las nucleasas ARN-inducidas son unas enzimas que cortan el ADN guiadas por una secuencia corta de ARN que reconoce una secuencia diana. Esta secuencia guía
20 (denominada *guide RNA*, gRNA) recluta la nucleasa que contiene los dominios de corte del ADN (dominios nucleasa) para inducir un corte en el ADN específico de secuencia. Algunos ejemplos de la familia de nucleasas ARN-inducidas son las proteínas CRISPR-Cas, que incluyen, sin limitar a, Cas9, Cpf1 (también conocida como Cas12a), C2C1 (también conocida como Cas12b), C2C2 (también conocida como Cas13a), CasX,
25 CasY, Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas10 y similares. La nucleasa ARN-inducida puede ser un homólogo de la familia CRISPR-Cas como las descritas anteriormente o similares, pero también puede ser una proteína de la familia CRISPR-Cas modificada. Por ejemplo, puede ser una nucleasa modificada en la que uno (*nickase-modified nuclease*) o ambos (dCas9) de los dominios nucleasas han sido
30 inactivados mediante mutación, o en la que una enzima o similar ha sido fusionada con Cas9 como, por ejemplo, sin limitar a, las nucleasas empleadas en *base-editing* and *prime-editing*. También pueden ser usadas nucleasas en las que la especificidad ha sido mejorada mediante manipulación genética como Cas9-HF, HiFi-cas9 o eCas9. Así, en otra realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, solo o en
35 combinación con las anteriores realizaciones particulares, la nucleasa es una nucleasa

de la familia Cas que, en otra realización todavía más particular, dicha nucleasa de la familia Cas es Cas9, Cas12 o Cas13. En el caso de la nucleasa Cas9, ésta puede incluir las derivadas de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus thermophilus*, *Geobacillus stearothermophilus* y similares. La secuencia de aminoácidos de la Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes* en esta realización se muestra en la SEQ ID NO: 12 (de aquí en adelante referida en algunas ocasiones como SpCas9). En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de interés, tal y como se describe en la presente invención, es la SEQ ID NO: 3. En el caso de la nucleasa Cpf1, esta puede incluir las derivadas de *Acidaminococcus*, *Lachnospira*, *Chlamydomonas*, *Francisella novicida* y similares.

En otra realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, la nucleasa es una nucleasa artificial. En el contexto de la presente invención, una nucleasa artificial es una enzima de restricción artificial que contiene un dominio de unión a ADN específicamente diseñado para reconocer una determinada secuencia de ADN diana fusionado con un dominio nucleasa proveniente, por ejemplo, de una enzima de restricción. Hay varios tipos de nucleasas artificiales entre las que se incluyen, pero sin estar limitadas a, Zinc Finger nucleases (ZFN), Transcription activator-like effector nuclease (TALEN), meganucleases y similares. Así, en una realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, sola o en combinación con las realizaciones anteriores, la nucleasa es una nucleasa de la familia TALEN o ZNF.

Alternativamente a la nucleasa, la proteína de interés de la secuencia de nucleótidos de la invención puede ser una proteína tóxica para las células.

En una realización particular de la secuencia de nucleótidos de la invención, sola o en combinación con las realizaciones particulares anteriores, la proteína tóxica para la célula es la proteína caspasa 8, la proteína caspasa 9, la proteína timidina quinasa, la proteína citosina deaminasa, la proteína de la toxina de la difteria o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas.

Dentro del contexto de la presente invención, también se incluyen variantes funcionalmente equivalentes de la proteína caspasa 8, la proteína caspasa 9, la proteína timidina quinasa, la proteína citosina deaminasa y la proteína de la toxina de la difteria. Se entiende por “variante funcionalmente equivalente” de una proteína “x” a aquella

proteína que (i) comprende una secuencia en la que uno o más aminoácidos están sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un aminoácido conservado), o (ii) comprende una secuencia que comprende una inserción o una delección de uno o más aminoácidos, y que tiene la misma función que
5 la proteína "x", es decir, es tóxica para las células. Ensayos sobre cómo comprobar si una proteína es tóxica para las células, y por lo tanto equivalente a las proteínas citadas en la realización particular anterior, son ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

10 Como entiende el experto en la materia, la secuencia de nucleótidos de la invención puede ir incorporada dentro de un vector. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención, de aquí en adelante "vector de la invención".

15 Un "vector" es capaz de transferir secuencias de genes a células diana. Normalmente, la "construcción de vector", el "vector de expresión" y el "vector de transferencia génica" significan cualquier construcción de ácidos nucleicos capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir las secuencias de genes a células diana. Así, el término incluye la clonación y la transferencia de genes, así como la integración de los
20 vectores o genes.

El vector de la invención es un vector o un plásmido biológicamente funcional, tal como un vector de clonación o un vector de expresión. Se puede usar cualquier vector siempre y cuando sea replicable y viable en las células en las que se introduce.

25 En la presente invención se entiende por "vector de expresión", a una construcción génica que se emplea para introducir y expresar un gen específico (que en esta invención codifica una proteína de interés) en una célula de interés (en esta invención una célula de sarcoma de Ewing). El vector puede ser un plásmido. Un plásmido es una
30 molécula de ADN extra-cromosómica, separada del ADN cromosómico de la célula y que se replica independientemente de éste. Generalmente los plásmidos son circulares y poseen dos hebras del ácido nucleico. Alternativamente, el plásmido puede diseñarse para que su contenido se inserte dentro del ADN genómico mediante recombinación genética. Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores adecuados,
35 y estos están disponibles en el mercado. En general, la secuencia de nucleótidos de la

invención se inserta en el vector en un sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados por procedimientos estándares. Estos procedimientos y los de subclonación relacionados se consideran parte de los conocimientos de los expertos en la materia. Ejemplos de vectores que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitar a, vectores virales y no virales. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de vectores virales que pueden incluir la secuencia de nucleótidos o la construcción génica de la invención incluyen, por ejemplo, un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector adenoasociado, un virus herpes simplex o un retrovirus. Así, en otra realización particular del vector de la invención, el vector es un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector adenoasociado, un virus herpes simplex o un retrovirus o un vector de expresión no viral. Entre los vectores no virales se pueden citar los vectores bacterianos, de los que existen numerosos ejemplos, incluyendo cualquier plásmido (de expresión o no) descrito para bacterias (*E. coli*, *Bacillus sp.*, etc.) o sus modificaciones, etc. Adicionalmente, dichos vectores pueden derivar de vectores de expresión comerciales, tales como los comercializados por Promega (e.g., plásmidos PinPoint Xa, etc.), Invitrogen (e.g., plásmidos del sistema Gateway, etc.), Amersham (e.g., plásmidos pGEX, etc.), Ingenius (e.g., pINK vector, etc.), Sigma (e.g., BICEP vectors, etc.), etc. Alternativamente, el vector de la invención puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia descritos.

Otros elementos que puede comprender el vector de la invención son, por ejemplo, orígenes de replicación, secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción y genes marcadores que permiten la identificación de las células que han incorporado el vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención.

Un "marcador de selección", "gen marcador de selección" o "gen indicador" incluye cualquier gen que confiere un fenotipo a una célula en el que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de las células que se transfectan o se transforman con un vector o una construcción de ácido nucleico como la descrita en el presente documento.

Los marcadores adecuados pueden seleccionarse de marcadores que confieren resistencia antibiótica, que introducen un nuevo rasgo metabólico o que permiten selección visual. Como ejemplos de genes marcadores de selección se incluyen genes que confieren resistencia a antibióticos (tales como nptII que fosforila neomicina y canamicina, o hpt, que fosforila higromicina, o genes que confieren resistencia a, por ejemplo, bleomicina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, gentamicina,

geneticina (G418), espectinomycin o blasticidina), o genes que proporcionan un rasgo metabólico. La expresión de genes marcadores visuales da como resultado la formación de color (por ejemplo 13-glucuronidasa, GUS o 13-galactosidasa con sus sustratos de color, por ejemplo X-Gal), luminiscencia (tal como el sistema luciferina/luciferasa) o fluorescencia (Proteína Fluorescente Verde, GFP, y derivados de los mismos). Esta lista solo representa una pequeña cantidad de marcadores posibles. El experto está familiarizado con dichos marcadores. Dependiendo del organismo y del procedimiento de selección se prefieren diferentes marcadores. Si se desea, los marcadores genéticos pueden ser eliminados de la célula huésped en una etapa posterior.

10

Una vez definido el vector de la invención, éste puede introducirse en la célula huésped. El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células que pueden ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una célula que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención o el vector de la invención, de aquí en adelante “célula de la invención”.

15

Métodos para introducir construcciones génicas o vectores dentro de una célula son ampliamente conocidos por el experto en la materia y su empleo es práctica habitual en el laboratorio. El término “introducir” en el contexto de la presente invención hace referencia a la incorporación de una secuencia de nucleótidos en una célula mediante “transfección” o “transformación” o “transducción”, donde la secuencia de nucleótidos puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, ADN mitocondrial), o ser un replicón autónomo, o expresarse de forma transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). Como se usa en el presente documento, los términos “transformada”, “transformada de modo estable” o “transgénica”, con referencia a una célula, significan que la célula tiene una secuencia de nucleótidos no nativa (heteróloga) integrada en su genoma, o en un plásmido episomal que se mantiene a través de múltiples generaciones, o expresada transitoriamente.

20

25

30

Ejemplos de métodos para introducir vectores en células huésped incluyen, sin limitar a, electroporación; microinyección nuclear o microinyección directa en células simples; fusión de protoplastos bacterianos con células intactas; uso de policones, por ejemplo, polibreno o poliornitina; fusión de membrana con liposomas, transfección mediada por lipofectamina, o lipofección; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles

35

recubiertos de ADN; incubación con precipitación del ADN-fosfato de calcio; transfección mediada con DEAE-dextrano; infección con ácidos nucleicos virales modificados; transferencia de ADN mediada por *Agrobacterium* y similares.

5 Formas de administrar a un sujeto la secuencia de nucleótidos de la invención o el vector de la invención son ampliamente conocidos en el estado de técnica, tales como vesículas, nanopartículas, etc. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una nanopartícula, una vesícula extracelular o una partícula similar a virus (*virus-like particle* o VLP) que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención o el
10 vector de la invención. De aquí en adelante “nanopartícula, vesícula extracelular o VLP de la invención”.

En general, una “nanopartícula” se refiere a cualquier partícula que presenta un diámetro de menos de 1.000 nm, por ejemplo, desde 20 nm a 500 nm, desde 30 nm a 300 nm,
15 desde 50 nm a 150 nm. Las nanopartículas descritas pueden incluir nanopartículas que tienen un diámetro de va desde 60 hasta 200 nm, o desde 70 a 150 nm o desde 80 a 130 nm.

Como entiende el experto en la materia, tanto la secuencia de nucleótidos, como el
20 vector, la célula, la nanopartícula, vesícula extracelular o VLP de la invención pueden estar comprendidos dentro de una composición. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, y/o una nanopartícula, una vesícula
25 extracelular o una VLP de la invención.

La composición de la invención puede emplearse en el tratamiento del sarcoma de Ewing, por lo que tendrá que estar formulada para su administración a un individuo. Así, en una realización particular, la composición de la invención es una composición
30 farmacéutica.

Tal como se usa en la presente invención, la expresión “composición farmacéutica” hace referencia a una formulación que ha sido adaptada para administrar una dosis predeterminada del compuesto de la invención a una célula, un grupo de células, un
35 órgano, un tejido o un sujeto. Además, los elementos que comprenden la composición

farmacéutica, es decir, la secuencia de nucleótidos, el vector, la célula, la nanopartícula, la vesícula extracelular y/o el VLP de la invención puede estar en una cantidad terapéuticamente efectiva. La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva”, tal como se utiliza en la presente descripción, se entiende como una cantidad capaz de proporcionar un efecto terapéutico, y que puede ser determinada por la persona experta en el arte mediante medios utilizados comúnmente. La cantidad del compuesto de la invención que puede ser incluido en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención variarán dependiendo del sujeto y el modo particular de administración. La dosificación apropiada del principio o principios activos dentro de la composición farmacéutica dependerá del tipo de enfermedad que va a ser tratada, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, de si la composición se administra por razones preventivas o terapéuticas, una terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la composición, y del criterio del médico. La cantidad del compuesto de la invención es adecuadamente administrada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, un nivel de dosificación apropiado será generalmente de aproximadamente entre 1×10^{10} y 1×10^{20} partículas virales o nanopartículas, vesículas extracelulares o VLPs de la invención. Los compuestos pueden ser administrados en un régimen de 1 a diversas veces por día o por dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete días, preferiblemente una vez cada dos días. La composición farmacéutica puede ser administrada durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 o más días, preferiblemente durante 14 días. La composición farmacéutica puede ser administrada preferiblemente una vez cada dos días durante 14 días.

La composición o composición farmacéutica de la invención puede además contener uno o diversos vehículos y/o excipientes. Así, en otra realización particular, la composición de la invención comprende, además, un vehículo y/o excipiente, que, en otra realización más particular, es un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Vehículos y excipientes empleados en la elaboración de composiciones son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, y su empleo es práctica de rutina para el experto en la materia. En una realización particular, el vehículo o el excipiente son farmacéuticamente aceptables. Por “excipiente farmacéuticamente aceptable” se entiende una sustancia terapéuticamente inactiva que se utiliza para incorporar el ingrediente activo y que es aceptable para el paciente desde un punto de vista

farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico que lo produce desde un punto de vista físico/químico con respecto a la composición, formulación, estabilidad, aceptación del paciente y biodisponibilidad. El excipiente o vehículo también incluye cualquier sustancia que sirva para mejorar la administración y la efectividad del principio

5 activo dentro de la composición farmacéutica. Entre los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen uno o más de entre agua, suero fisiológico, solución tampón de fosfatos, dextrosa, glicerol, etanol y similares, además de combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro

10 de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden además comprender menores cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil en almacenamiento o la efectividad de las composiciones que forman parte de las composiciones farmacéuticas. Los ejemplos de vehículos adecuados se conocen bien

15 en la literatura. Son ejemplos de vehículos sin limitación, una serie de sacáridos tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, y maltitol; una serie de almidones tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz y almidón de patata; una serie de celulosas tales como celulosa, metilcelulosa, carboximetil celulosa sódica, y hidroxilpropilmetilcelulosa; y una serie de sustancias de relleno tales

20 como gelatina y polivinilpirrolidona. En algunos casos, puede añadirse un desintegrante tal como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico, o alginato de sodio.

La composición de la invención puede comprender, además, compuestos útiles en el tratamiento de cáncer, en particular, en el tratamiento de sarcoma de Ewing, para

25 complementar y/o aumentar la eficacia del tratamiento. Por lo tanto, en otra realización particular, sola o en combinación con el resto de las realizaciones particulares, la composición de la invención comprende, además, un agente quimioterapéutico. Ejemplo de agentes quimioterapéuticos útiles en el tratamiento del sarcoma de Ewing incluyen, sin limitar a, vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, ifosfamida, etopósido, irinotecan,

30 temozolamida, actinomicina D, gencitabina, docetaxel o topotecan.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier tipo de vía adecuada, tal como por vía oral, nasal, ocular, tópica, intradérmica, intracraneal, vía intravenosa/parenteral o intratumoral. En otra realización particular de

35 la composición de la invención, sola o en combinación con las realizaciones particulares

anteriores, la composición está formulada para su administración oral, parenteral o intratumoral.

5 La administración por “vía oral” se entiende como la composición farmacéutica incorporada al organismo tras la deglución. La administración por “vía intravenosa” o “via parenteral” se entiende como la administración de la composición farmacéutica mediante inyección en el flujo sanguíneo. La administración por “vía intratumoral” se entiende como la administración de la composición farmacéutica inyectada directamente en el tumor o cerca de este.

10

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un kit que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, la nanopartícula, la vesícula extracelular o la VLP de la invención, y/o la composición de la invención.

15

Tal como se ha explicado al comienzo de la presente descripción, la invención se relaciona con una herramienta para expresar proteínas con potencial terapéutico de manera específica en las células de sarcoma de Ewing. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, la nanopartícula, la vesícula extracelular o la VLP de la invención, la composición de la invención, y/o el kit de la invención para su uso como medicamento.

20

Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con la secuencia de nucleótidos de la invención, el vector de la invención, la célula de la invención, la nanopartícula, la vesícula extracelular o la VLP de la invención, la composición de la invención, y/o el kit de la invención para su uso en el tratamiento de sarcoma de Ewing.

25

En la presente invención se entiende por “terapia” o “tratamiento” a la administración a un individuo de un compuesto, o combinación de compuestos, con el objetivo de inhibir una enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo; aliviar una enfermedad o condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica; y/o estabilizar una enfermedad o condición patológica en un individuo. En la presente invención, la enfermedad o condición patológica es el sarcoma de Ewing.

35

En la presente invención el término “individuo” es equivalente al término “sujeto”, por lo que ambos términos pueden emplearse indistintamente a lo largo de la presente descripción. Se entiende por “individuo”, cualquier animal perteneciente a cualquier especie. No obstante, en una realización particular, el sujeto es un mamífero, preferiblemente, un primate, más preferiblemente, un ser humano de cualquier raza, sexo o edad. El individuo objeto de la presente invención padece sarcoma de Ewing. La enfermedad sarcoma de Ewing ha sido descrito al inicio de la presente descripción.

10 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** es una representación gráfica de la invención en donde se representa la secuencia de nucleótidos aislada objeto de esta invención que comprende una secuencia reguladora formada por n repeticiones de GGAA y una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de interés que puede ser una nucleasa (p. ej. Cas9), una proteína tóxica para las células (Proteína T, p. ej. iCasp9) o una proteína inmunomoduladora (Proteína I que induce una respuesta inmune). Esta secuencia de nucleótidos aislada puede ser transferida a las células diana (células de sarcoma de Ewing) mediante diferentes tipos de vectores virales y no virales. En una realización particular de la invención, la proteína de interés es una nucleasa Cas9 que es expresada específicamente en células de sarcoma de Ewing gracias a la especificidad que le otorga la secuencia reguladora, la cual permite expresar la proteína de interés Cas9 solo en las células de sarcoma de Ewing que expresan la proteína quimérica EWSR1-FLI1 (o alguna otra de las proteínas quiméricas equivalentes). En presencia de una guía RNA dirigida contra EWSR1-FLI1, se produce el corte del ADN de EWSR1-FLI1 y su inactivación, lo que en último término provoca que las células tumorales dejen de proliferar. En las células normales no existe expresión de Cas9 y por tanto no se produce ningún corte sobre el ADN.

La **figura 2** representa los experimentos realizados para demostrar la capacidad de la secuencia reguladora rica en repeticiones GGAA para regular la expresión de la proteína de interés, en este caso Cas9. Las células de sarcoma de Ewing A673 (A) y MHH-ES1 (B) fueron infectadas con lentivirus conteniendo la secuencia promGGAA-Cas9 y la secuencia promGGAA-less-Cas9 (sin repeticiones GGAA) y los niveles de Cas9 se analizaron mediante western-blot. Se utilizaron como control de carga la expresión de

la proteína EWSR1-FLI1 y la de la tubulina. Como control positivo de la expresión de Cas9 se utilizó la línea celular A673 que fue genéticamente modificada para expresar Cas9 de forma constitutiva. La proteína Cas9 solo pudo ser detectada en las células infectadas con promGGAA-Cas9 pero no con promGGAA-less-Cas9, demostrando que
5 la secuencia reguladora promGGAA es capaz de regular la expresión de Cas9 en células de sarcoma de Ewing.

La **figura 3** representa los experimentos realizados para demostrar que la secuencia reguladora no es activa en otro tipo de sarcoma (fibrosarcoma) diferente al del sarcoma de Ewing a pesar de expresar FLI1 nativo. Las células de fibrosarcoma HT1080 fueron infectadas con lentivirus conteniendo la secuencia promGGAA-Cas9 y la secuencia promGGAA-less-Cas9 (sin repeticiones GGAA) y los niveles de Cas9 se analizaron mediante western-blot. Se utilizaron como control de carga la expresión de la proteína FLI1 y la de la tubulina. Como control positivo de la expresión de Cas9 se utilizó la línea
10 celular A673 que fue genéticamente modificada para expresar Cas9 de forma constitutiva. La proteína Cas9 no pudo ser detectada en las células HT1080 infectadas con promGGAA-Cas9 ni con promGGAA-less-Cas9, demostrando que la secuencia reguladora promGGAA no es activa en células como las HT-1080, aunque estas expresen niveles elevados de la proteína FLI1 nativa.

20 La **figura 4** muestra el efecto de la expresión de Cas9 y una guía RNA dirigida contra el exón 2 de FLI1 en células A673. Las células de sarcoma de Ewing A673 se coinfectaron con los vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 y vectores lentivirales de expresión de una guía ARN (sgRNAs) diseñada para producir cortes en el ADN codificante del exón 2 de FLI1. Cuando las células A673 se coinfectaron con los
25 vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y sgRNA exón 2 se observó un porcentaje de edición génica alrededor del 50% que se mantuvo estable durante aproximadamente 40 días de cultivo. Sin embargo, cuando las células se coinfectaron con los vectores lentivirales promGGAA-less-Cas9 y sgRNA exón 2, el nivel de edición génica detectado
30 fue muy inferior al observado anteriormente y en todo caso se mantuvo estable durante todo el experimento en niveles cercanos al límite de detección de la técnica.

La **figura 5** muestra el potencial terapéutico de la expresión específica de Cas9 en células de sarcoma de Ewing. Las células de sarcoma de Ewing A673 se coinfectaron
35 con los vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 y las guías ARN

dirigidas contra el exón 2 de FLI1 y el exón 9 de FLI1 y se cuantificaron los tiempos de duplicación celular medido en horas. En (A) se muestran los resultados obtenidos en células infectadas con el vector lentiviral promGGAA-less-Cas9 o el vector lentiviral promGGAA-Cas9 y la guía RNA dirigida contra el exón 2 de FLI1. En este caso no se detectaron diferencias en el tiempo de duplicación de las células A673. En (B) se muestran los resultados obtenidos en células infectadas con el vector lentiviral promGGAA-less-Cas9 o el vector lentiviral promGGAA-Cas9 y la guía RNA dirigida contra el exón 9 de FLI1. En este caso se observó que el tiempo de duplicación en las células infectadas con la gRNA exón 9 de FLI1 y el vector lentiviral promGGAA-Cas9 se duplicó en comparación al tiempo de duplicación observado en las células infectadas con la gRNA exón 9 de FLI1 y el vector lentiviral promGGAA-less-Cas9.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

I - MATERIAL Y MÉTODOS

20 **Cultivo celular**

Se utilizaron dos líneas de sarcoma de Ewing, A673 y MHH-ES1, que expresan la proteína quimérica EWSR1-FLI1, con la diferencia de que las células A673 expresan la proteína de fusión de tipo I y las MHH-ES1 la de tipo II. También se utilizó una línea de fibrosarcoma, HT1080, que no expresa la proteína quimérica EWSR1-FLI1 pero sí FLI1 nativo. Las células A673 y HT1080 fueron cultivadas en DMEM con 10% de suero bovino fetal (FBS) suplementado con penicilina y estreptomina. MHH-ES1 fueron cultivadas en RPMI con 10% FBS suplementado con penicilina y estreptomina. Para los medios de selección tras la infección con los vectores lentivirales, se añadió Blastidina (5 µg/ml) para la selección de las células infectadas con el vector lentiviral del promotor unido a Cas9 e Higromicina B Gold (350 µg/mL) para seleccionar las células infectadas con el vector lentiviral de las guías RNA.

Preparación de vectores lentivirales con el promotor GGAA unido a Cas9

Para la generación de los vectores lentivirales con el promotor GGAA (promGGAA-Cas9, SEQ ID NO: 1) unido a Cas9 se utilizaron los servicios de una empresa

especializada (VectorBuilder, Chicago, USA). La secuencia de repeticiones GGAA presente en el promotor del gen NR0B1 de las células de sarcoma de Ewing A4573 se clonó delante de la secuencia codificante para la proteína hCas9 (SEQ ID NO: 3). Además, se fabricó otro vector lentiviral en el que las secuencias GGAA fueron eliminadas de la SEQ ID NO: 1 (promGGAA-less-Cas9, control negativo) (SEQ ID NO: 2). El resto de elementos del vector lentiviral fueron los considerados estándares para los vectores lentivirales de tercera generación.

Infección con lentivirus

Las células fueron coinfectadas con lentivirus conteniendo las diferentes construcciones de los promotores anteriormente mencionados, y en paralelo con lentivirus conteniendo vectores de expresión para las guías (sgRNA) dirigidas contra el exón 2 de FLI1 (no presente en la proteína quimérica EWSR1-FLI1, utilizado como un control de edición que no afecta a EWSR1-FLI1) y contra el exón 9 de FLI1 (presente en la proteína quimérica EWSR1-FLI1 y que por tanto su edición afecta a la funcionalidad de la proteína EWSR1-FLI1). Para la generación de estos vectores de expresión lentivirales de las guías RNAs se utilizaron los servicios de una empresa especializada (VectorBuilder, Chicago, USA). En estos vectores, la expresión de la guía RNA está bajo el control de un promotor U6, siendo el resto de los elementos del vector lentiviral los considerados estándares para los vectores de tercera generación. Tanto para los lentivirus de los promotores como para los de las sgRNA se utilizó una MOI de 5. A los tiempos indicados se recogieron alícuotas de células para la extracción de ADN, y extracción de proteínas.

Análisis expresión proteica

La expresión de Cas9 en las células infectadas con los vectores promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 se analizó mediante western-blot. Las células se lisaron en tampón RIPA estándar y la concentración de proteínas se cuantificó mediante el método del BCA (Pierce). Un total de 20 µg de extracto proteico se cargaron en un gel PAGE-SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF mediante la técnica de transferencia semi-seca. Como control positivo de Cas9 se usaron extractos celulares de células que expresan Cas9 bajo el promotor constitutivo CMV (descrito en Cervera ST et al 2021 doi:10.3390/cancers13153783). Las membranas fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpos anti-Cas9 (Abcam #ab191468, dilución 1:1,000), anti-FLI1 (Abcam #ab133485, dilución 1:250) (que reconoce EWSR1-FLI1 y FLI1 nativo)

y anti-tubulina (Abcam #185067, dilución 1:10,000) como control de carga. Las membranas se incubaron posteriormente con un anticuerpo secundario unido a HRP y fueron reveladas usando el reactivo quimioluminiscente IMMOBILON (MERCK).

5 **Análisis edición génica**

Para determinar los niveles de edición génica se extrajo el ADN celular a diferentes tiempos. Este ADN se utilizó como molde para amplificar mediante PCR la región genómica de interés que comprendía las regiones de unión de las guías ARN del exón 2 y del exón 9 de FLI1 y regiones adyacentes. Los cebadores/primers utilizados en la PCR fueron los siguientes: Directo Exón 9 FL1: 5'-TCTCTGGGCTGAGGTGTTCT-3' (SEQ ID NO: 8); Reverso Exón 9 FLI1: 5'- ATTCATGTTGGGCTTGCTTT- 3' (SEQ ID NO: 9); Directo Exón 2 FLI1: 5'- TGTCACCTTGCTTGGGTGAAG-3' (SEQ ID NO: 10); Reverso Exón 2 FLI1: 5'- GTTGACCCTCACTGGCTGAT-3' (SEQ ID NO: 11). Cada uno de los amplicones generados se secuenció mediante secuenciación Sanger. El porcentaje de edición génica (generación de indels) se determinó mediante análisis de los electroforegramas Sanger con la aplicación SYNTHOGO (Synthego Corporation, California, USA).

Análisis proliferación celular

Para determinar el efecto de la edición génica sobre la proliferación celular se realizó un experimento para cuantificar el tiempo de duplicación. Para ello, las células infectadas con los vectores lentivirales de promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 y las guías RNA exón 2 y exón 9 de FLI1 se mantuvieron en crecimiento continuo durante 45-50 días en placas de 100 mm, determinando en cada uno de los ciclos de tripsinización-sembrado el número de duplicaciones celulares y el tiempo medio de duplicación en cada ciclo. Básicamente las células se sembraron a una densidad establecida en una placa de 100 mm y cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-85%, se tripsinizaron y se contó el número de células viables usando una solución de Trypan Blue y un contador de células automático (NanoEntek). El número de duplicaciones así como el tiempo (t) de duplicación se calcularon usando las siguientes fórmulas:

$$\text{n}^{\circ} \text{ de duplicaciones} = \log_2 (\text{n}^{\circ} \text{ de células (tiempo inicial)} / \text{n}^{\circ} \text{ de células (tiempo final)})$$

$$t \text{ duplicación} = t \text{ (entre cada ciclo)} / \text{n}^{\circ} \text{ de duplicaciones celulares (entre cada ciclo)}$$

35

Al final de cada ciclo, una alícuota de las células fue almacenada para su posterior extracción de ADN, ARN y proteínas.

II – RESULTADOS

5

Ejemplo 1. Expresión de una proteína de interés terapéutico de manera específica en células de sarcoma de Ewing

A continuación, se analizó la capacidad de la secuencia promGGAA para inducir de manera específica la expresión de una proteína con interés terapéutico en las propias
10 células de sarcoma de Ewing. Las células de sarcoma de Ewing A673 y MHH-ES1 se infectaron con los vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 y la expresión de la proteína Cas9 se determinó por western-blot. La figura 2 muestra los resultados obtenidos en estos experimentos. La expresión de Cas9 fue claramente detectada en ambas células de sarcoma de Ewing cuando las células fueron infectadas
15 con el vector promGGAA-Cas9, pero no cuando las mismas células fueron infectadas con el promGGAA-less-Cas9. Ambas células fueron infectadas con una eficiencia similar ya que la expresión de la proteína GFP presente en los vectores lentivirales fue similar en todos los casos, por lo que las diferencias de expresión en la proteína Cas9 solo pueden ser achacables a la presencia de repeticiones GGAA en el promotor.

20

Ejemplo 2. Análisis especificidad de la expresión de una proteína de interés en otras células diferentes a las de sarcoma de Ewing.

Para demostrar que la expresión de una proteína de interés bajo la regulación del promGGAA es exclusiva de las células de sarcoma de Ewing, se realizó un experimento
25 en una línea celular que no expresa EWSR1-FLI1. Para ello se eligieron las células HT1080 (derivadas de un fibrosarcoma) porque estas células no expresan EWSR1-FLI1, pero si FLI1 nativo, y por lo tanto son un modelo ideal para evaluar la especificidad del promGGAA como secuencia reguladora. Estas células se infectaron con los vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 y la expresión de la proteína Cas9
30 se determinó por western-blot. La figura 3 muestra los resultados obtenidos en estos experimentos. La expresión de Cas9 no pudo ser detectada en las células infectadas con el vector promGGAA-Cas9 ni con el vector promGGAA-less-Cas9, demostrando que el promotor GGAA solo es capaz de inducir la expresión de un gen de interés en el caso de las células de sarcoma de Ewing que expresan la proteína oncogénica EWSR1-
35 FLI1. Conviene destacar que las células HT-1080 expresan elevados niveles de FLI1

nativo como se pudo demostrar por western-blot, a pesar de lo cual no hubo inducción de la expresión de Cas9. Ambas células fueron infectadas con una eficiencia similar como lo demuestra la expresión de la proteína GFP presente en los vectores lentivirales, por lo que la ausencia de expresión de Cas9 no puede ser achacable a una infección
5 deficiente.

Ejemplo 3. Potencial terapéutico de la expresión específica de Cas9 en células de sarcoma de Ewing.

Para evaluar el potencial terapéutico de la expresión específica de Cas9 en células de sarcoma de Ewing se coinfectaron las células de sarcoma de Ewing A673 con los
10 vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 y vectores lentivirales de expresión de una guía ARN (sgRNAs) diseñada para producir cortes en el ADN codificante del exón 2 de FLI1. Nosotros elegimos esta guía RNA en el exón 2 de FLI1 para estos experimentos porque la edición génica en este exón no afecta a la expresión
15 de EWSR1-FLI1 ya que el exón 2 de FLI1 no está incluido en la fusión EWSR1-FLI1. De esta manera es posible estudiar la eficiencia de la edición sin comprometer la viabilidad celular. Las secuencias correspondientes a la gRNA y sgRNA del exón 2 se muestran en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6, respectivamente. Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la figura 4. Cuando las células A673 se coinfectaron con
20 los vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y sgRNA exón 2 se observó un porcentaje de edición génica alrededor del 50% que se mantuvo estable durante aproximadamente 40 días de cultivo. Sin embargo, cuando las células se coinfectaron con los vectores lentivirales promGGAA-less-Cas9 y gRNA exón 2, el nivel de edición génica detectado fue muy inferior al observado anteriormente y en todo caso se mantuvo estable durante
25 todo el experimento en niveles cercanos al límite de detección de la técnica.

A continuación, y para demostrar el potencial terapéutico de la expresión específica de Cas9 en células de sarcoma de Ewing, se analizó el efecto de la edición génica sobre la proliferación celular. Para ello se coinfectaron las células de sarcoma de Ewing con
30 los vectores lentivirales promGGAA-Cas9 y promGGAA-less-Cas9 y las guías ARN dirigidas contra el exón 2 de FLI1 y el exón 9 de FLI1. Las secuencias correspondientes a la gRNA y sgRNA del exón 9 se muestran en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7, respectivamente. En este caso, y al contrario que la guía dirigida al exón 2 de FLI1, la guía dirigida al exón 9, provoca la inactivación génica de EWSR1-FLI1 ya que se
35 producen mutaciones en el exón 9 de FLI1 que si forma parte de la fusión EWSR1-FLI1

y además codifica para el dominio de unión al ADN. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 5. Cuando las células A673 se coinfectaron con la gRNA exón 2 de FLI1 y el vector lentiviral promGGAA-less-Cas9 o el vector lentiviral promGGAA-Cas9 no se detectaron diferencias en el tiempo de duplicación de las células

5 A673. Este resultado es compatible con el hecho de que la edición génica en el exón 2 de FLI1 no afecta a la proliferación de las células de sarcoma de Ewing ya que, aunque la expresión de Cas9 se induce en las células A673 infectadas con el vector lentiviral promGGAA-Cas9 (cómo se demuestra en la figura 2), y se observa edición en el exón 2 de FLI1 (cómo se demuestra en figura 4), esto no se traduce en una disminución de

10 la velocidad de duplicación celular. Sin embargo, cuando las células A673 se infectaron con la gRNA exón 9 de FLI1 y el vector lentiviral promGGAA-less-Cas9 o el vector lentiviral promGGAA-Cas9 se observaron diferencias importantes en el tiempo de duplicación. En concreto, se observó que el tiempo de duplicación en las células infectadas con la gRNA exón 9 de FLI1 y el vector lentiviral promGGAA-Cas9 se duplicó

15 en comparación al tiempo de duplicación observado en las células infectadas con la gRNA exón 9 de FLI1 y el vector lentiviral promGGAA-less-Cas9. Esto significa que en las células infectadas con la gRNA exón 9 de FLI1 y el vector lentiviral promGGAA-less-Cas9 no hay expresión de Cas9 (Figura 2) y por tanto no hay edición significativa. Sin embargo, en las células infectadas con la gRNA exón 9 de FLI1 y el vector lentiviral

20 promGGAA-Cas9 hay una elevada expresión de Cas9 y en consecuencia pueden producirse cortes en el exón 9 de FLI1 que afectan a la integridad del gen de fusión EWSR1-FLI1, dando lugar consecuentemente a una ralentización de la proliferación celular.

25

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos aislada que comprende
 - (i) una secuencia reguladora de la expresión génica donde dicha secuencia reguladora es específica de células de sarcoma de Ewing y comprende n repeticiones de la secuencia GGAA o TTCC, en donde n es un número entero igual o mayor de 1; y
 - (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, en donde la secuencia (i) regula la expresión de la secuencia (ii).
2. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1, en donde la secuencia reguladora de la expresión génica además comprende
 - (i) una secuencia promotora de un gen regulado positivamente en células de sarcoma de Ewing por la proteína quimérica EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4 o EWSR1-FEV, o un fragmento de dicho promotor,
 - (ii) una secuencia potenciadora de la expresión o *enhancer* de un gen regulado positivamente en células de sarcoma de Ewing por la proteína quimérica EWSR1-FLI1, EWSR1-ERG, EWSR1-ETV1, EWSR1-ETV4 o EWSR1-FEV, o un fragmento de dicha secuencia potenciadora de la expresión, o
 - (iii) una secuencia reguladora TATA.
3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 2, en donde la secuencia promotora es el promotor del gen NR0B1 o un fragmento de dicho promotor funcionalmente equivalente.
4. Secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia GGAA o TTCC es una secuencia GGAA o TTCC degenerada, preferiblemente, la secuencia GGAA degenerada es la secuencia GGGGA, GGAG, GAGG, AGGG, GAAA, AGAA, AAGA o AAAG y la secuencia TTCC degenerada es la secuencia CCCT, CCTC, CTCC, TCCC, CTTT, TCTT, TTCT o TTTC.
5. Secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde n es un número entero de desde 2 hasta 1.000.
6. Secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína de interés es una nucleasa o una proteína tóxica para las células.

7. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6, en donde la nucleasa es una nucleasa de la familia TALEN, ZNF o Cas.
- 5 8. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7, en donde la nucleasa de la familia Cas es Cas9, Cas12 o Cas13.
9. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6, en donde la nucleasa o proteína tóxica para las células se selecciona de la lista que consiste en: la proteína caspasa 8, 10 la proteína caspasa 9, la proteína timidina quinasa, la proteína citosina deaminasa, la proteína de la toxina de la difteria, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dichas proteínas.
10. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las 15 reivindicaciones 1 a 9.
11. Un vector según la reivindicación 10, en donde el vector es un vector lentiviral, un vector adenoviral, un vector adenoasociado, un vector retroviral, un vector herpes simplex o un vector de expresión no viral.
- 20 12. Una célula que comprende el vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.
13. Una nanopartícula, una vesícula extracelular o una partícula similar a virus (*virus-like particle*) que comprende la secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las 25 reivindicaciones 1 a 9.
14. Una composición que comprende la secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el vector según la reivindicación 10 u 11, la célula según 30 la reivindicación 12, y/o la nanopartícula, vesícula extracelular o partícula similar a virus según la reivindicación 13.
15. Composición según la reivindicación 14, que comprende, además, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35

16. Composición según la reivindicación 14 o 15, que comprende, además, un agente quimioterapéutico.

5 17. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la composición está formulada para su administración oral, parenteral o intratumoral.

10 18. Un kit que comprende la secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el vector según la reivindicación 10 u 11, la célula según la reivindicación 12, la nanopartícula, la vesícula extracelular o la partícula similar a virus según la reivindicación 13, o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17.

15 19. La secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el vector según la reivindicación 10 u 11, la célula según la reivindicación 12, la nanopartícula, la vesícula extracelular o la partícula similar a virus según la reivindicación 13, la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, o el kit según la reivindicación 18, para su uso como medicamento.

20 20. La secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el vector según la reivindicación 10 u 11, la célula según la reivindicación 12, la nanopartícula, la vesícula extracelular o la partícula similar a virus según la reivindicación 13, la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, o el kit según la reivindicación 18, para su uso en el tratamiento de sarcoma de Ewing.

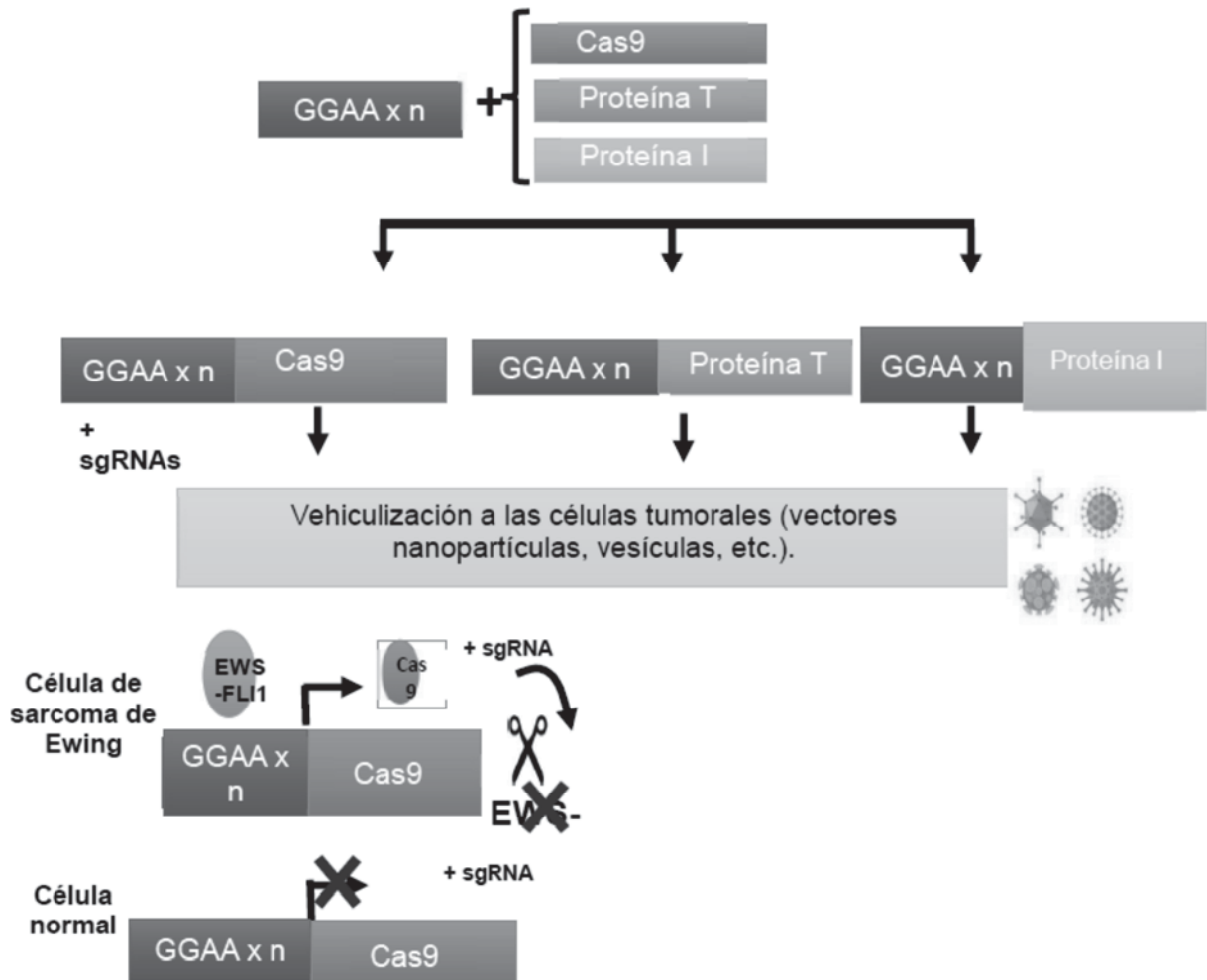


Fig. 1

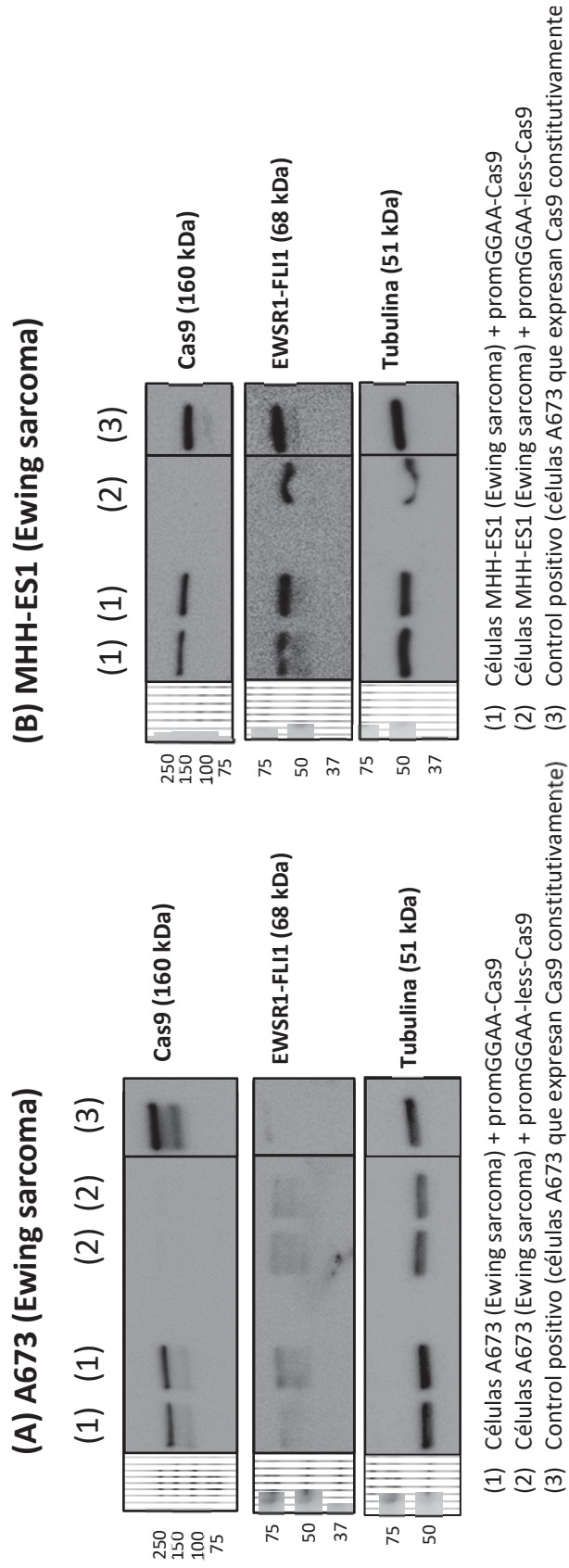
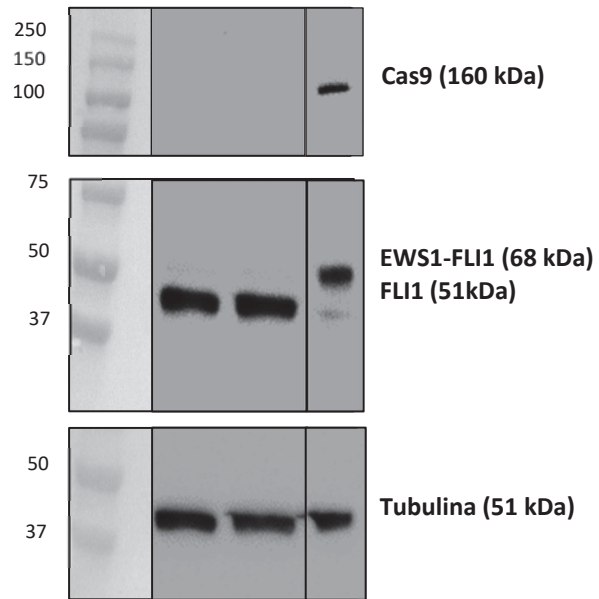


FIG. 2

HT1080 (fibrosarcoma)

(1) (2) (3)



- (1) Células HT-1080 (fibrosarcoma) + promGGAA-Cas9
- (2) Células HT-1080 (fibrosarcoma) + promGGAA-less-Cas9
- (3) Control positivo (células A673 que expresan Cas9 constitutivamente)

FIG. 3

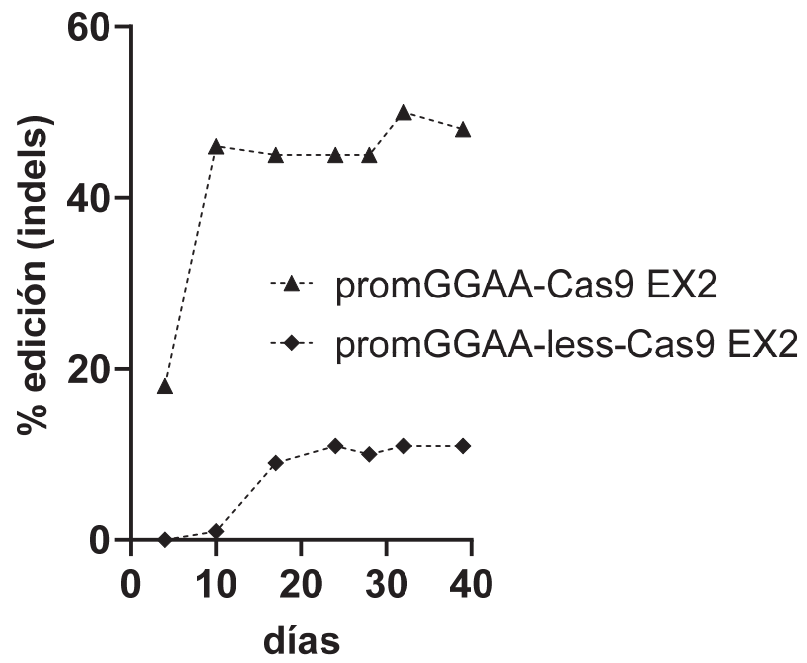


FIG. 4

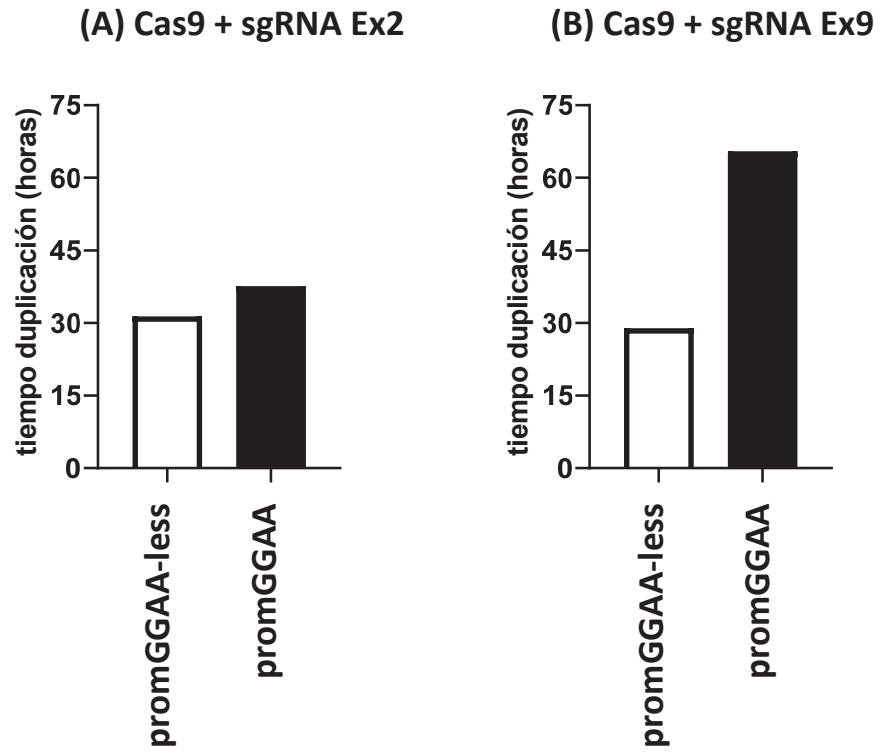


FIG. 5



- ②① N.º solicitud: 202230352
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCIA-ARAGONCILLO E et al. DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. <i>Oncogene</i> OCT 9 2008, 30/09/2008, Vol. 27, Páginas 6034-6043, ISSN 0950-9232(print) ISSN 1476-5594(electronic), <DOI: doi:10.1038/onc.2008.203>. Materiales y métodos; Figura 1.	1-5, 10, 12, 14, 18
X	MONUMENT MICHAEL J et al. Clinical and Biochemical Function of Polymorphic NR0B1 GGAA-Microsatellites in Ewing Sarcoma: A Report from the Children's Oncology Group. <i>PLoS One</i> AUG 5 2014, 05/08/2014, Vol. 9, Páginas Article No.: e104378, ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic), <DOI: doi: 10.1371/journal.pone.0104378>. Materiales y métodos; Figura 5a.	1-5, 10, 12, 14, 18
X	US 2002068815 A1 (MCCABE EDWARD R B et al.) 06/06/2002, Párrafos [0017], [0100]-[0102], [0267]-[0270]; Figura 7b; Reivindicaciones 2-6.	1-6, 9-12, 19
X	WO 03038101 A1 (ISIS INNOVATION et al.) 08/05/2003, Página 2, líneas 14-25; Página 3, líneas 1-8; Página 7, línea 3- página 9, línea 2; Ejemplo 7; Figuras 1-4; Reivindicaciones 1-12, 35, 36, 42	1, 5, 10-17, 19
A	CERVERA SAINT T et al. Therapeutic Potential of EWSR1-FLI1 Inactivation by CRISPR/Cas9 in Ewing Sarcoma. <i>Cancers</i> AUG 2021, 31/07/2021, Vol. 13, Páginas Article No.: 3783, ISSN 2072-6694(electronic), <DOI: doi:10.3390/cancers13153783>. todo el documento.	1-20
A	TRICHE TIMOTHY J et al. Gene editing for functional analysis of Ewing sarcoma target genes. <i>Cancer Research</i> JUL 2018, 30/06/2018, Vol. 78, Páginas 402, ISSN 0008-5472(print) ISSN 1538-7445(electronic), <DOI: doi:10.1158/1538-7445.AM2018-402>. todo el documento.	1-20
A	KOVAR HEINRICH. Blocking the road, stopping the engine or killing the driver? Advances in targeting EWS/FLI-1 fusion in Ewing sarcoma as novel therapy. <i>Expert Opinion on Therapeutic Targets</i> NOV 2014, 31/10/2014, Vol. 18, Páginas 1315-1328, ISSN 1472-8222(print) ISSN 1744-7631(electronic), <DOI: doi:10.1517/14728222.2014.947963>. todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
08.03.2023

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/3



- 21 N.º solicitud: 202230352
22 Fecha de presentación de la solicitud: 19.04.2022
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ARNALDEZ FERNANDA I et al. New Strategies in Ewing Sarcoma: Lost in Translation?. Clinical Cancer Research JUN 15 2014, 31/05/2014, Vol. 20, Páginas 3050-3056, ISSN 1078-0432(print) ISSN 1557-3265(electronic), <DOI: doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0633>. todo el documento.	1-20
A	GRUNEWALD T G P et al. Ewing sarcoma. Nature Reviews Disease Primers 20181201 Nature Publishing Group gbr., 01/12/2018, Vol. 4, ISSN 2056-676X (electronic), <DOI: doi:10.1038/s41572-018-0003-x pubmed:29977059>. todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.03.2023

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/113 (2010.01)

C12N15/85 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, EMBL-EBI, INTERNET