



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 295 037**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00946124 .5**

(86) Fecha de presentación : **17.07.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1198239**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **24.04.2002**

(54) Título: **Procedimientos que utilizan el sistema toxina/antitoxina bacteriana ParD kis/ParD kid para destruir células eucariotas.**

(30) Prioridad: **16.07.1999 GB 9916810**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

(73) Titular/es: **Cancer Research Ventures Limited
Cambridge House, 6-10 Cambridge Terrace
Regent's Park, London NW1 4JL, GB**

(72) Inventor/es: **De la Cueva Méndez, Guillermo;
Laskey, Ronald Alfred;
Mills, Anthony David y
Díaz Orejas, Ramón**

(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

Procedimientos que utilizan el sistema toxina/antitoxina bacteriana ParD kis/ParD kid para destruir células eucariotas.

La presente invención está relacionada con la destrucción de células, o al menos impedir la progresión del ciclo celular. Más particularmente está relacionada con procedimientos y medios para atacar células eucariotas, como por ejemplo células tumorales, con agentes citostáticos, citotóxicos y/o citopáticos. Específicamente, la presente invención utiliza la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis bajo control apropiado para la inhibición selectiva del ciclo celular y/o la muerte de células diana.

Existen varias situaciones en las que resulta deseable matar células, en particular matar selectivamente ciertas células dentro de una población de células. En algunas situaciones puede ser suficiente la inhibición del crecimiento o la proliferación celular, por ejemplo impidiendo la progresión del ciclo celular. Para simplificar, en el presente documento las referencias a la muerte de células también incluyen dicha inhibición, excepto cuando el contexto sugiera lo contrario.

Un importante campo de aplicación es el tratamiento de tumores, cáncer, soriasis, arteriosclerosis y otros desórdenes hiperproliferativos. Otras aplicaciones de las realizaciones de la presente invención incluyen marcar cualquier célula eucariota para matarla o al menos para inhibir su crecimiento. Esto puede incluir el “*knock-out*” de linajes celulares y la ablación celular dirigida, por ejemplo en el control del desarrollo, o en estudios de organogénesis. Las aplicaciones *in vitro* incluyen el estudio del control de la replicación en células procariotas y/o eucariotas, el cribado de un antídoto para una toxina, o de una toxina inhibida por un antídoto, el diseño de cribado para factores de toxina y/o antídoto mejorados, y el análisis de respuestas fisiológicas de diferentes tipos celulares para la inhibición de la progresión celular y/o la inhibición de la replicación del ADN.

Las respuestas de defensa a patógenos en las plantas incluyen la necrosis celular, por ejemplo favorecidas en un lugar de infección o de entrada de un patógeno. La resistencia inducida está estrechamente relacionada con la respuesta hipersensible (RH), y la respuesta inducida está asociada con la muerte celular localizada en lugares en los que ha habido intentos de entrada de un patógeno. La hipótesis es que mediante la RH la planta priva al patógeno de células hospedadoras vivas.

Muchos mecanismos de defensa vegetales son inducidos de manera intensa en respuesta a la agresión de un patógeno infructuoso. Tal inducción de resistencia mejorada puede ser sistémica. Se cree que cuando una planta es agredida por un patógeno al que es resistente, esta provoca una RH en el lugar del intento de ingreso del patógeno incompatible. La RH inducida lleva a la mejora sistémica y a la adquisición por la planta de resistencia a los patógenos virulentos que normalmente causarían enfermedades en la planta no agredida.

La inducción artificial de la muerte celular en plantas se ha mostrado capaz de proporcionar resistencia a patógenos, incluso en casos donde el mecanismo que induce la muerte celular no está facilitada por ningún gen de resistencia patógena. Por ejemplo, los genes que codifican sustancias que llevan a la muerte celular súbita, por ejemplo BARNASE o la toxina de difteria, pueden utilizarse para inducir los cambios que llevan a la resistencia adquirida incluso cuando la muerte celular en estos últimos ejemplos no está provocada por la activación de la respuesta de defensa. BARNASE es una ribonucleasa de *Bacillus amyloliquifaciens* (Hartley (1988)) J. Mol. Biol. 202: 913-915; Hartley (1989) Trends Biochem. Sci. 14:450-454) y existe una proteína correspondiente llamada BARSTAR que inhibe el BARNASE formando un complejo con él.

El empleo de realizaciones de la presente invención en plantas puede usarse para generar protección contra ataques de hongos, bacterias, virus o nemátodos.

Las plantas particularmente interesantes para su utilización en las realizaciones de la presente invención incluyen cereales, maíz, trigo, cebada, avena, arroz, Brassicas, curcubitas, patatas, tomates, algodón, semilla de soja, y zanahoria.

Otro uso de realizaciones de la presente invención en plantas incluye la generación de esterilidad en machos (Mariani et al. Nature 357 384-387). Por ejemplo puede introducirse una toxina o un sistema de toxinas según la presente invención en plantas bajo las condiciones de control apropiadas para la expresión específica del tapete de las anteras (Seurinck et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:3403; Koltunow et al. (1990) Plant Cell 2, 1201-1224; Mariani et al (1990) Nature 347:737-741). La esterilidad masculina en plantas facilita la generación de semillas híbridas mediante la prevención de la autopolinización, permitiendo a los técnicos agrónomos aprovechar el llamado “vigor híbrido” mediante el cual los cruces entre cepas de plantas cruzadas a menudo resultan en una progenie con un mayor rendimiento y una resistencia mejorada a las enfermedades. Disponer de plantas de horticultura u ornamentales sin la capacidad de generar polen puede utilizarse para reducir problemas alérgicos de los habitantes o por razones estéticas (por ejemplo, en los lirios, donde los pistilos en la actualidad deben eliminarse a mano).

Un uso adicional en plantas es la generación de la ausencia de semillas, a menudo deseable por comodidad y sabor cuando se producen, por ejemplo, sandías, uvas, naranjas y frutas relacionadas, tomates, pimientos, pepinos y demás. La toxina puede colocarse bajo el control de regulación de un promotor específico para semillas, como por ejemplo

el promotor de una proteína de almacenamiento de semillas (Higgins *et al.* (1984) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35: 191-221; Goldberg *et al.* (1989) *Cell* 56:149-160). Los ejemplos de promotores específicos de semillas incluyen los de la β -faseolina de semilla (Sengupta-Gopalan *et al.* (1985) *PNAS US* 82:3320-3324), lectina de semilla (Voelker *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:3571-3577), lectina de semilla de soja (Ocamuro *et al.* (1986) *PNAS USA* 83:8240-8344), napina de colza (Radke *et al.* *Theor. Appl. Genet.* 75:685-694), zeína del maíz (Hoffman *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:3213-3221), β -hordeína de cebada (Marris *et al.* (1988) *Plant Mol. Biol.* 10:359-366) y glutenina de trigo (Colot *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:3559-3564).

Los plásmidos procariotas han desarrollado diferentes sistemas genéticos que incrementan su mantenimiento estable en hospedadores bacterianos. Estos sistemas se clasifican en dos tipos diferentes: sistemas de partición, que aseguran un reparto bien controlado de las copias de ADN plasmídico entre las dos células hijas, y los sistemas asesinos, que eliminan de la población bacteriana aquellas células hijas que han perdido el plásmido durante la división (Yarmolinsky, *Science* (1995) Feb 10,267 (5199):836-7). Estos últimos están formados de dos componentes: una toxina bacteriana (siempre una proteína), y su antídoto (una proteína o un ARN antisentido que inhibe la transcripción de su compañero asesino) (Jensen y Gerdes, *Mol. Microbiol.* (1995) Jul. 17 (2):205-10; Thisted *et al.* *J. Mol. Biol.* (1992). Jan. 5 223 (1):41-54). Estos sistemas asesinos generalmente están organizados de manera similar desde un punto de vista molecular, y varios mecanismos aseguran que un sistema asesino normal no esté activado si la estabilidad del plásmido que lo contiene no está en compromiso. Así, tanto el antídoto proteico como los componentes tóxicos se organizan en un operón bicistrónico, y el sistema está diseñado a nivel molecular de manera que tanto los procesos transcripcionales como traduccionales están optimizados para mantenerlo en estado latente (es decir, en un estado en el que el componente tóxico se neutraliza con su antídoto) (Jensen y Gerdes, *Mol. Microbiol.* (1995) Jul 17 (2):205-10; Holcik and Iyer, *Microbiology* (1997), 143:3403-3416).

En circunstancias normales, los dos componentes de un sistema asesino se sintetizan en el hospedador mediante el plásmido que los contiene a un nivel basal, permitiendo que el hospedador sobreviva. Si después de la división celular aparece una bacteria segregante (es decir, una bacteria que ha perdido el plásmido), otra de las características de estos sistemas permite la activación del proceso de muerte con el objetivo de señalar esa célula específica: es decir, la estabilidad del antídoto es menor que la toxina. Así, sin una síntesis continua del antídoto, su degradación preferente lleva a la aparición de una toxina no neutralizada que en ese momento es capaz de aplicar su efecto letal sobre el hospedador. Este efecto tóxico puede aplicarse sobre dianas celulares diferentes, dependiendo del sistema asesino específico, por ejemplo replicación dependiente de DnaB (parD, pem), complejo ADN-girasa (ccd), inhibición de la síntesis de proteínas (KicB), y formación de septum (kil), (para referencias ver Holcik y Iyer, *Microbiology* (1997), 143, 3403-3416). En *Science*, Vol. 267 (1995), Yarmolinsky describe otras "moléculas adictivas" putativas como los enzimas de restricción tipo II (toxinas putativas) Pae R7 y EcoRI, y sus metilasas conocidas, que mejoran la estabilidad aparente de sus plásmidos de unión (la referencia original para estos módulos de adicción está en Naito *et al.* *Science* 267:897 (1995)). Yarmolinsky también describe en este trabajo una pareja de sistemas asesinos putativos a partir del bacteriófago lambda (proteína Rex) y una pareja de cadenas de *E. coli* que tienen el clúster de genes prr, que codifica una nucleasa anticodón que puede activarse mediante un polipéptido de 26 residuos del bacteriófago T4 y que a continuación rompe un ARN de transferencia importante para la incorporación de lisina a las proteínas. T4 es invulnerable a esta proteína porque codifica una pareja de proteínas no esenciales en otras situaciones que reparan el daño. También describe cadenas de *E. coli* que tienen el profago e14 defectuoso, y que consigue la exclusión por rotura del factor de elongación Tu e inhibe la traducción de manera global.

ParD es uno de esos sistemas asesinos (Bravo *et al.* *Mol. Gen. Genet.* (1987) Nov. 210 (1):101-10; Bravo *et al.* *Mol. Gen. Genet.* (1988). Dec. 215 (1):146-51). Está codificado mediante un plásmido R1 Gram negativo y está compuesto de dos genes: kis (como supresor letal) y kid (como determinante letal) que codifican el antídoto (10 KDa) y la toxina (12 KDa) respectivamente. ParD es un sistema asesino críptico que está estrechamente regulado para evitar su activación bajo condiciones que no comprometan la estabilidad de R1. Así, está controlado por transcripción acoplada (Ruiz-Echevarria *et al.* *Mol. Microbiol.* (1991) Nov. 5 (11): 2685-93), mediante el procesamiento post-transcripcional de su ARNm bicistrónico (Ruiz-Echevarria *et al.* *Mol. Gen. Genet.* (1995) Sep. 20 248 (5):599-609), mediante traducción solapada (Ruiz-Echevarria *et al.* *Mol. Gen. Genet.* (1995) Sep. 20 248 (5):599-609), y mediante una interacción intensa entre Kis y Kid para formar un complejo no tóxico que, a la vez, es capaz de reprimir la transcripción de su propio promotor (Ruiz-Echevarria *et al.* *Mol. Microbiol.* (1991) Nov. 5 (11):2685-93). La organización genética de ParD favorece la transcripción acoplada, la traducción solapada y la modificación post-transcripcional de algunos de los ARNm obtenidos. Los complejos Kis/kid reprimen la transcripción de los genes Kis y Kid.

Se han descrito homólogos de ParD, al menos en el plásmido R100 (sistema pem) (Tsuchimoto *et al.* *J. Bacteriol.* (1988) Apr. 170 (4):1461-6; Tsuchimoto *et al.* *J. Bacteriol.* (1992) Jul. 174 (13):4205-11; Tsuchimoto *et al.* *Mol. Gen. Genet.* (1993) Feb. 237 (1-2): 81-88; Masuda *et al.* *J. Bacteriol.* (1993) Nov. 175 (21): 6850-6) y en cromosomas de *E. coli* (sistemas ChpA y ChpB) (Tsuchimoto *et al.* *Mol. Gen. Genet.* (1993) Feb. 237 (1-2):81-88). Se han encontrado otros mediante la búsqueda en bases de datos.

Kid inhibe la iniciación de la replicación del genoma de *E. coli* y de plásmidos DnaB de replicación dependiente (es decir, la helicasa principal de *E. coli*) (Ruiz-Echevarria *et al.* *J. Mol. Biol.* (1995) Apr. 7 247 (4):568-77), y la sobre-expresión de los últimos minimiza el efecto tóxico del primero en el organismo *in vivo* (Ruiz-Echevarria *et al.* *J. Mol. Biol.* (1995) Apr. 7 247 (4): 568-77), sugiriendo que el DnaB está involucrado en el mecanismo de inhibición por Kid. Observaciones recientes en el laboratorio de los inventores sugieren de manera muy clara que esta inhibición no es debida a la separación en solución de los complejos hexaméricos de DnaB ni a la inhibición de su actividad helicasa

sobre una amplia variedad de sustratos incluyendo oriC, el origen de replicación del genoma de *E. coli*. Sin pretender limitar la invención a causa de suposiciones teóricas, puede ser que la carga del origen de replicación con DnaB sea el proceso inhibido por Kid, ya sea por interacción directa entre ellos y/o mediados a través de un tercer componente (ADN o proteína) no descrita todavía. Actualmente, la investigación está enfocada a la identificación del mecanismo exacto de acción de Kid desde un punto de vista molecular.

Antes del trabajo de los inventores descrito en el presente documento no era obvio que los sistemas procariotas que han evolucionado para funciones específicas en bacterias podían tener función en células eucariotas.

Por ejemplo, en un sistema asesino de dos componentes como el que implica a Kis/Kid, ambos componentes necesitan ejercer sus funciones respectivas - la toxina matar células en ausencia de antídoto (o cuando el antídoto está presente en exceso), y el antídoto tanto para neutralizar la toxina como para controlarla, por ejemplo mediante un mecanismo que implica un recambio rápido. Preferiblemente, la toxina no tiene ningún efecto secundario en la viabilidad de la célula. En cambio, la muerte celular preferiblemente es través de un mecanismo programado de muerte celular tal como la apoptosis. En plantas puede que sea preferible para ciertas aplicaciones inducir una respuesta necrótica, por ejemplo inducir o mejorar la resistencia patógena.

Los presentes inventores han mostrado que la toxina bacteriana y el antídoto son funcionales en células eucariotas, levaduras, *Xenopus* y células de mamífero (en particular de humano), y puede controlarse para inhibir la progresión del ciclo celular y la proliferación celular y para matar células. En los experimentos descritos más adelante se muestra que las células pueden matarse mediante apoptosis.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados de los experimentos que muestran que un promotor inducido por Curl utilizado más tarde para el control de la expresión del antídoto Kis y un promotor diferente reprimido por metionina utilizado más tarde para el control de la expresión de la toxina Kid son funcionales en *S. cerevisiae*. La gráfica muestra unidades de actividad β -galactosidasa a diferentes concentraciones (μ M) de los factores de regulación Cu^{2+} (círculos claros) y Met (círculos oscuros).

La Figura 2 muestra los resultados de los experimentos que demuestran el efecto de la doxyciclina sobre la actividad del promotor regulable de tetraciclina (Tet Pr) en células HeLa (barras claras), este promotor utilizado más tarde para el control de la expresión del antídoto Kis (en el vector pTRE-Luc), y en ausencia de efecto de la doxyciclina en la actividad del promotor temprano de citomegalovirus (CMV Pr) (barras oscuras), siendo este promotor utilizado más tarde para el control de la expresión de la toxina Kid (pCMV-Luc). La actividad luciferasa está dibujada en unidades arbitrarias.

La Figura 3 muestra varios constructos utilizados para la expresión de Kis y/o Kid en células HeLa.

La Figura 4 muestra los resultados de los experimentos en los que la expresión de kis se moduló mediante doxyciclina en cultivos de células HeLa transfectadas establemente con pNATHAi y pNATHA2i (Figura 3). La expresión de Kid se controló mediante CMV Pr la cual no está afectada por la doxyciclina.

La Figura 5 muestra los resultados de los experimentos (número de células muertas) en los que la expresión de kis se moduló mediante doxyciclina en cultivos de células HeLa transfectadas establemente con pNATHAi y pNATHA2i (Figura 5). La expresión de Kis se controló mediante Tet Pr que no está afectada por la doxyciclina, mientras que la expresión de kid se controló mediante CMV Pr que no está afectado por la doxyciclina.

La Figura 6 muestra la aparición del marcador de apoptosis anexina V en células sujetas a los experimentos de los que se muestran los resultados en la Figura 5, mostrando que la muerte celular causada por Kid implica apoptosis.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona una composición que comprende:

- (i) la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis, o
- (ii) ácido nucleico que codifica la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis,

para su uso en un método terapéutico de inhibición de la proliferación celular y/o de la progresión del ciclo celular que se lleva a cabo sobre un cuerpo animal o humano, comprendiendo el método proporcionar la toxina y la antitoxina a las células eucariotas del cuerpo humano o animal, bajo el control apropiado para la inhibición selectiva del ciclo celular y/o para matar las células diana.

Según un segundo aspecto de la invención, uso de una composición que comprende:

- (i) la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis, o
- (ii) ácido nucleico que codifica la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis,

en la fabricación de una composición medicamentosa para su uso en un método terapéutico de inhibición de la proliferación celular y/o la progresión del ciclo celular llevado a cabo sobre el cuerpo humano o animal, comprendiendo el método proporcionar la toxina y la antitoxina a las células eucariotas en el cuerpo humano o animal, bajo el control apropiado para la inhibición selectiva del ciclo celular y/o la muerte de las células diana.

Un tercer aspecto de la invención es un método de inhibición de la proliferación celular y/o la progresión del ciclo celular, comprendiendo el método proporcionar la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis a las células eucariotas bajo el control apropiado para la inhibición selectiva del ciclo celular y/o la muerte de las células diana, donde las células son *in vitro* y/o son células vegetales.

En aspectos de la presente invención preferiblemente se utilizan algunas medidas de control de la acción de la toxina. Los sistemas bacterianos de muerte celular que se utilizan en la presente invención de manera natural utilizan la antitoxina PaD kis. Los presentes inventores han mostrado que ambas toxinas y antitoxinas son funcionales en varias células eucariotas y que sus respectivas actividades pueden controlarse para la inhibición selectiva de la proliferación celular o para impedir la progresión del ciclo celular, y/o la inducción de la muerte celular programada.

El sistema bacteriano de muerte celular utilizado en la presente invención comprende una toxina y una antitoxina que son proteínas. Tales sistemas asesinos se denominan en el estado de la técnica "sistema proteico genético asesino" - Jensen & Gerdes, 1995, Mol. Microbiol. (1995) Jul 17 (2):205-10). El sistema asesino bacteriano utilizado en la invención es un sistema *E. coli*.

Ejemplos de sistemas bacterianos asesinos (para referencias ver, Holcik y Iyer (1997), Microbiology, 143:3403-3416 y sus referencias, y "Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread" (1999), Ed. C M Thomas, Howard Academic Publishers, capítulo 2), incluyen un sistema de genes asesinos proteicos con plásmido bacteriano terminal (en inglés "*bacterial plasmid-borne proteic killer gene system*") como por ejemplo ParD (o R1 u homólogos como se describe arriba) ccdA (H o let A) del plásmido F (antídoto) y toxina ccdB (G, letB o letD) que actúa envenenando complejos ADN girasa (Jaffé, *et al.* (1985), Bacteriol, 163:841-849) nótese que el sistema ParD es notablemente similar a aquél del sistema Ccd, la proteína tóxica del bacteriófago P1 Doc con antídoto Phd (Lehnher, *et al.* (1993), Mol. Biol., 233:414-428), parDE del plásmido RK2 (Roberts *et al.*, 1994 J. Mol. Biol. 268, 27109-27117), con proteína tóxica ParE y antídoto ParD, y hig del plásmido Rtsl (Tian *et al.*, 1996, Biochem biophys Res Commun 220 280-284) con antídoto higA para toxina higB.

Ejemplos adicionales de sistemas bacterianos asesinos donde el antídoto natural es un ARN antisentido incluyen parB del plásmido R1 (Gerdes, *et al.*, (1990a), New Biol, 2:946-956) con toxina Hok y antídoto Sok (Thisted *et al.*, 1994, EMBO J. 13, 1950-1959; el ARNm de hok es muy estable pero el ARN de sok se desvanece muy rápidamente), srnB (Onishi, (1975), Science, 187:257-258) flm (Loh, *et al.* (1988), Gene, 66:259-268) del plásmido F y pnd tanto de plásmido R483 Incl como de plásmido R16 IncB (Akimoto y Ohnishi (1982), Microbiol. Immunol., 26: 779-793), relF del operón cromosómico relB de *E. coli* (la inducción del gen relF lleva a la misma respuesta fisiológica que la expresión del gen hok - Gerdes, *et al.* (1986a), EMBO J. 5:2023-2029), homólogos relB (Gronlund y Gerdes, 1999, J. Mol. Biol. 285, 1401-1415) y Gef (también cromosómico) que es estructural y funcionalmente similar a las proteínas codificadas por hok y reIF (Poulsen, *et al.* (1989), Mol. Microbiol., 3:1463-1472). La proteína Gef es tóxica y está regulada mediante el ARN antisentido Sof.

Sistemas adicionales incluyen el operón epsilon SegB (antídoto) y zeta (toxina) de pSM19035 y pDB101 (Ceglowski *et al.* (1993) Mol. Gen. Genet. 241 (5-6):579-85; Ceglowski *et al.* (1993) Gene 136 (1-2):1-12), kicA (antídoto) y kicB (toxina) que se encuentran en el cromosoma de *E. coli* (Feng, *et al.* (1984), Mol. Gen. Genet., 243:136-147), y los sistemas kil/kor transportados por plásmidos bacterianos de los grupos de incompatibilidad P: y N. Ver Holcik y Iyer (Microbiology (1997) 143:3403-3416) para ejemplos y referencias. Ver también Jensen y Gerdes (Mol. Microbiol. (1995) 17(2), 205-210) y Yarmolinsky (Science, (1995) 267, 836-837) para resúmenes de sistemas de sistemas asesinos proteicos genéticos con sorprendentes similitudes tanto en la estructura como en la función.

La toxina ParD Kid se utiliza en la presente invención con el respectivo antídoto, la antitoxina ParD kis. Como se describe en el presente documento, adicionalmente la toxina puede emplearse con uno o más de otros elementos que inhiben o bloquean su actividad (lo cual puede ocurrir mediante la inhibición o el bloqueo de su producción).

Tanto la toxina como el antídoto se introducen en las células eucariotas bajo el control apropiado de la inhibición selectiva del ciclo y/o la muerte celular.

Un procedimiento de la invención puede incluir proporcionar toxina ParD kid y antitoxina ParD kis a células eucariotas y, en las células diana, eliminar o inhibir la antitoxina para permitir que la toxina actúe. La producción o actividad de la antitoxina puede inhibirse o bloquearse. Esto puede conseguirse proporcionando un estímulo apropiado, por ejemplo una molécula inductora o represora de un promotor que controla la producción de antitoxina, o puede ocurrir bajo condiciones que sean predominantes en las células diana. Tal como se discute a continuación, como estímulo de control puede usarse la presencia de una forma diferente de una proteína, como por ejemplo p53, en las células dianas frente a las células no diana (por ejemplo, en las células p53 tumorales y no tumorales). Puede proporcionarse una molécula inductora o represora a las células diana para inhibir o bloquear la antitoxina y/o sobreregular ("*upregulate*") la toxina.

Generalmente, el sistema de muerte celular es proporcionado a las células mediante el ácido nucleico que codifica los componentes relevantes y, cuando sea aplicable, elementos de control (como se discute a continuación).

Los elementos de control pueden incluir cualquiera, o más de uno, de los disponibles en la técnica que permita la variación selectiva de la relación entre la toxina y la antitoxina. Los ejemplos incluyen un promotor que pueda inducirse, reprimirse, o que constitutivo, constructos antisentido y sus activantes o represores, ribozimas, secuencias de unión y factores de unión, sistemas recombinantes (por ejemplo, Cre-lox o FLP); sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), naturales o modificados, (Schmid y Wimmer (1994), Arch. Virol. Suppl., 9:279-89; Borman, *et al.* (1994), EMBO J., 1:13 (13):3149-57) e inhibidores IRES como por ejemplo ARN de una levadura que inhibe la entrada de los ribosomas a ciertos IRES (Das, *et al.* (1996), J. Virol., 70(3):1624-32; Das *et al.* (1998), J. Virol., 72 (7):6638-47; Das, *et al.* (1998), Front Biosci., 1:3:D1241-52; Venkatesan, *et al.* (1999), Nucleic Acids Res. 15:27 (2):562-72), elementos que permiten la interferencia transcripcional entre promotores (Greger y Proudfoot (1998), 17:17(16):4771-9; Eggermont y Proudfoot (1993), EMBO J., 12(6):2539-48; Bateman y Paule (1998), Cell, 23:54 (7):985-92; Ponnambalam y Busby (1987), FEBS Lett., 9:212 (1):21-7; Greger, *et al.* (1998), Nucleic Acids Res., 1:26 (5):1294-301), intrones proteicos (Chong *et al.* (1996) J. Biol Chem 271(16):22159-68).

Puede proporcionarse un vector eucariota, que comprende ácido nucleico que codifica una toxina o un sistema de muerte celular, tal como se ha descrito. Tal vector puede usarse para proporcionar la toxina o el sistema de muerte celular a células eucariotas.

El ácido nucleico que codifica una toxina bacteriana y un antídoto puede proporcionarse como parte de un vector o vectores apropiados para la transformación de células eucariotas. Preferiblemente el vector es apropiado para la transformación de células diana, puede ser apropiado por ejemplo para la transformación de células vegetales (por ejemplo un vector *Agrobacterium*). Cuando se emplean dos componentes de un sistema de muerte celular bacteriano, o una toxina y un elemento de regulación específicamente diseñado (por ejemplo, antisentido o ribozima), se proporcionan preferiblemente en el mismo vector ambos componentes y los elementos reguladores para el control de la expresión, aunque pueden proporcionarse en vectores separados. Cada una o ambas secuencias de codificantes de nucleótidos pueden estar bajo el control transcripcional de un promotor específico y/o regulable. Pueden proporcionarse secuencias de codificación de la toxina y el antídoto que están orientadas cola a cola o invertidas, u orientadas cabeza a cola.

Preferiblemente, por ejemplo en levadura, el ácido nucleico que codifica la toxina se proporciona en un plásmido multicopia, tal como, para levaduras 2μ (Christianson, *et al.* (1992), Gene, 2:110 (1):119-22), para células de mamífero un vector que incluye oriP del virus Epstein Barr (que puede estar acompañado por la proteína de iniciación EBNA1 Kirchmaier y Sugden (1995), J. Virol., 69 (2):1280-3; Wendelburg y Vos (1998), Gene Ther., Oct:5(10):1389-99), o el origen del virus papiloma bovino (que necesita también dos proteínas víricas codificadas para ser activas (Piirsoo, *et al.* (1996), EMBO J., 2:15 (1):1-11), o un vector vírico.

Los vectores monocopia apropiados para la presente invención incluyen, para levadura, ARS1 y ARSH4/CEN6 (Sikorski y Hieter (1986), Genetics, 122 (1):19-27; Mumberg, *et al.* (1995), Gene, 14:156(1):119-22).

Los vectores apropiados pueden escogerse o construirse conteniendo las secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias de promotor, fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias de potenciador, genes marcadores y otras secuencias apropiadamente. Los vectores pueden ser plasmídicos y/o virales y mantenerse en células como episomas o integrados en el genoma. Para más detalles ver, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas de las técnicas conocidas y de los protocolos de manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992.

Según la presente invención, la toxina ParD kid y la antitoxina ParD Kis se pueden proporcionar a una célula eucariota seleccionada entre mamífera, humana o no humana como por ejemplo de conejo, de cerdo de guinea, de rata, de ratón u otro roedor, gato, perro, cerdo, cordero, cabra, vacuno o caballo, ave, como por ejemplo pollo, levadura, hongo, anfibio, pez, gusano, y plantas. Las plantas que pueden utilizarse en la presente invención ya se han indicado arriba.

Puede proporcionarse una célula eucariota que comprende ácido nucleico que codifica una toxina bacteriana o un sistema de muerte celular tal como se describe en el presente documento, bajo el control de regulación apropiado. El ácido nucleico puede estar integrado en el genoma (por ejemplo cromosoma) de la célula. La integración puede estar promovida por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, según las técnicas comunes. El ácido nucleico puede estar en un vector extra-cromosómico dentro de la célula.

Un método de la invención puede comprender introducir el ácido nucleico en una célula eucariota. La introducción, que puede denominarse de manera general, sin que suponga una limitación, como "transformación" (en particular para la introducción *in vitro*), puede utilizar cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas apropiadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, dextrano DEAE, electroporación, transfección mediada por liposoma y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insectos, baculovirus.

La introducción puede seguirse provocando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo cultivando las células (que pueden comprender células realmente transformadas aunque se prefiere que las células sean descendientes de las células transformadas) bajo las condiciones para la expresión de uno o más de los componentes del sistema, de manera que se produzca un producto codificado. Las condiciones pueden facilitar la muerte celular (o la inhibición de la progresión del ciclo celular, del crecimiento o la proliferación celular, etc.), y/o la neutralización del efecto tóxico cuando sea apropiado.

La introducción de ácido nucleico puede darse *in vivo* mediante terapia génica, tal como se discute más adelante. Una célula que contiene ácido nucleico codificando un sistema de acuerdo con la presente invención, por ejemplo como resultado de la introducción del ácido nucleico en la célula o en un ancestro de la célula y/o la alteración genética de la secuencia endógena de la célula o del ancestro (que puede introducirse o alterarse *in vivo* o *ex vivo*), puede estar comprendida en un organismo que sea animal, en particular mamífero, que puede ser humano o no-humano, levadura, hongo, anfibio, pez, gusano o planta, con los ejemplos ya indicados anteriormente. También se proporcionan animales genéticamente modificados o transgénicos, pájaros o plantas que comprenden dichas células.

Así, puede proporcionarse un animal no-humano con ácido nucleico que codifica un sistema bacteriano de muerte celular en su genoma (como se ha descrito). El animal puede ser un roedor, por ejemplo un ratón, y puede proporcionar un modelo animal para la investigación de aspectos del control del ciclo celular, la muerte celular, la apoptosis u otros procesos celulares, y el cribado de fármacos.

También puede proporcionarse una planta con ácido nucleico que codifica un sistema bacteriano de muerte celular en su genoma, una célula vegetal (que puede estar en cultivo, por ejemplo un cultivo en callo, o comprendida en una planta o en una parte de una planta), o una parte de una planta (por ejemplo, fruto, hoja, semilla u otro propágulo).

Para la generación de material vegetal que comprende ácido nucleico que codifica un sistema bacteriano de muerte celular tal como se ha descrito, puede emplearse cualquier medio de transformación apropiado. La transformación *Agrobacterium* es ampliamente utilizada por el experto en la materia para transformar tanto especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas. Cuando la *Agrobacterium* es ineficiente o inefectiva, son preferidos el bombardeo con microproyectiles, la electroporación y la captación directa de ADN. Alternativamente, puede utilizarse una combinación de diferentes técnicas, por ejemplo bombardeo con micropartículas recubiertas con *Agrobacterium* o bombardeo con micropartículas para inducir la penetración seguida del co-cultivo con *Agrobacterium*. A continuación de la transformación, se puede regenerar una planta, por ejemplo a partir de una célula, tejido de callo o discos de hojas, como es conocido en la técnica. Casi la totalidad de las plantas pueden regenerarse a partir de células, tejidos y órganos de la planta.

Cuando se utiliza una toxina bacteriana de muerte celular existen varias estrategias para controlar su actividad. Generalmente, se utiliza el antídoto relevante para neutralizar el efecto tóxico a menos que se desee la toxicidad o se llegue al nivel de toxicidad deseado. Así, por ejemplo, tanto la toxina como el antídoto pueden expresarse en células normales, infra-regulando (downregulating) la producción del antídoto en las células diana (por ejemplo las células tumorales). La producción de la toxina puede infra-regularse en las células normales y/o sobre-regularse en las células diana. La producción de antídoto puede sobre-regularse en las células normales y/o infra-regularse en las células diana.

La sobre-regulación de la producción de toxina y/o antídoto, dependiendo del contexto, puede conseguirse de varios modos. Una aproximación preferida es emplear un promotor u otro elemento regulador que pueda inducirse bajo determinadas condiciones, permitiendo el control de la expresión mediante la aplicación de un estímulo apropiado.

Puede emplearse un promotor tumoral específico como el promotor ARN telomerasa. En plantas pueden utilizarse promotores nematodos inducibles como TobRB7 (Opperman *et al.*, Science 263:221-223) y PRP1 (proteína relacionada con la patogénesis - ver, por ejemplo, Payne *et al.* (1989) Plant Molecular Biology 12:595-596; también, Memelink *et al.* (1990) Plant Molecular Biology 14:119-126 y Payne *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:98-102).

La infra-regulación de la toxina y/o el antídoto, de nuevo dependiendo del contexto, también puede conseguirse mediante la regulación de la expresión génica utilizando un promotor apropiado u otro elemento regulador, incluyendo un elemento represor, como por ejemplo Tet.Pr. Otras aproximaciones que pueden utilizarse incluyen la regulación antisentido y los ribozimas (descrito más ampliamente más adelante).

Así, por ejemplo, la producción de antídoto puede infra-regularse mediante la producción de un transcrito antisentido o ribozima. El transcrito antisentido o ribozima puede generarse mediante la aplicación de un estímulo apropiado, y puede generarse mediante la expresión a partir de una secuencia bajo el control transcripcional de un promotor inducible u otro elemento regulador.

Por "promotor" se entiende una secuencia de nucleótidos a partir de los cuales se puede iniciar la transcripción de ADN unido operativamente en el sentido 3' (es decir, en la dirección 3' de la cadena sentido del ADN de doble cadena).

"Unido operativamente" significa que forma parte de la misma molécula de ácido nucleico, posicionado y orientado convenientemente para que la transcripción se inicie desde el promotor. El ADN unido operativamente a un promotor está "bajo la regulación de iniciación transcripcional" del promotor.

El término “inducible” referido a un promotor es bien entendido por el experto en la materia. En esencia, la expresión que se encuentra bajo el control de un promotor inducible se “provoca” o se aumenta en respuesta a la aplicación de un estímulo (que puede generarse en el interior de la célula o proporcionarlo de manera exógena). La naturaleza de los estímulos varía entre promotores. Algunos promotores inducibles provocan niveles de expresión bajos o indetectables (o no provocan expresión) en ausencia del estímulo apropiado. Otros promotores inducibles provocan una expresión constitutiva detectable en ausencia del estímulo. Sea cual sea el nivel de expresión en ausencia del estímulo, la expresión de cualquier promotor inducible se incrementa en presencia del estímulo correcto. La situación preferida es cuando al aplicar el estímulo apropiado, el nivel de expresión aumenta en una cantidad efectiva para proporcionar el resultado deseado. Así, puede utilizarse un promotor inducible (o “switchable”) que provoca un nivel de expresión basal en ausencia del estímulo que es demasiado bajo para dar el resultado deseado (e incluso puede ser cero). A partir de la aplicación del estímulo, la expresión se incrementa (o se conecta) hasta un nivel que lleva al resultado deseado.

Los ejemplos de promotores inducibles para su uso en aspectos de la presente invención incluyen un promotor mínimo, tal como un promotor CMV mínimo, fusionado a un potenciador para la activación de p53 de tipo natural o la represión del mutante p53 tanto en el caso de que lleve la secuencia de unión de ADN de consenso para el p53 de tipo natural, por ejemplo el fragmento A (Kern, *et al.* (1991), *Science*, 252 (5013):1708-11) o CON (Chen, *et al.* (1993), *Oncogene*, 8 (8):2159-66), como si no, por ejemplo HIV 1-LTR (Subier, *et al.* (1994), *J. Virol.*, 68 (1):103-10; Gualberto y Baldwin (1995), *J. Biol. Chem.*, 25:270 (34):19680-3; Sawaya, *et al.* (1998), *J. Biol. Chem.*, 7:273 (32):20052-7, se han estudiado promotores inducibles o reprimibles tales como Tet Pr y la galactosa activable GAL10-CYC1. Los promotores apropiados para plantas incluyen el promotor inducible GST-II del maíz (Jepson *et al.* (1994), *Plant Molecular Biology* 26:1855-1866), promotor inducido por alcohol (por ejemplo alcR - ver, por ejemplo, Gatz (1998) *Nature Biotechnology* 16:140), y el promotor génico del virus 35S del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) que se expresa a niveles muy altos en prácticamente todos los tejidos vegetales (Benfey *et al.* (1990) *EMBO J* 9:1677-1684).

Como se indica, la producción de toxina puede infra-regularse en las células no diana mediante el uso de elementos para el control de la expresión. Alternativa o adicionalmente a la infra-regulación se puede utilizar ácido nucleico antisentido o ribozimas. Una o más de estas aproximaciones pueden utilizarse adicionalmente al uso de la antitoxina para neutralizar la actividad de la toxina. Como se ha descrito, puede controlarse la propia producción de la toxina.

En una de las aproximaciones preferidas, la selectividad por la expresión de la toxina en el interior de las células diana según la presente invención está determinada por la combinación de (i) la sobre-regulación de la producción de la toxina en las células diana y (ii) la infra-regulación de la producción de toxina en las células no diana y/o la neutralización de la actividad de la toxina en las células no diana (por ejemplo mediante la sobre-regulación de la producción de antídoto en las células no diana). El efecto (i) mediará la actividad deseada en las células diana, mientras que el efecto (ii) reducirá las pérdidas de expresión de dicha actividad en las células no diana.

Cuando las células diana son células tumorales, y las células no diana son células normales, en un gran porcentaje de tumores puede resultar una ventaja que p53 mute o que se inactive su función. La proteína p53 es un activador de la transcripción en células normales pero en los tumores humanos está presente en forma de mutante en una proporción sustancial (40-80%). Incluso en tumores en los que la secuencia p53 es de tipo natural, su función normal en el control del ciclo celular, reparación del ADN, diferenciación, plasticidad genómica o apoptosis puede derogarse, por ejemplo mediante la interacción con proteína celular (por ejemplo mdm2) o proteína oncoviral (por ejemplo antígeno SV40 T, proteína humana E6 de papilomavirus, proteína E1B de adenovirus, proteína X del virus de la hepatitis B, y la proteína BZLF-1 Epstein-Barr), o mediante el secuestro en el citoplasma, donde la proteína p53 no es funcional.

Así, la producción del antídoto (o el ARN antisentido o un ribozima dirigido contra la toxina) puede controlarse mediante un promotor la función del cual esté sobre-regulada mediante p53 de tipo natural en las células normales pero no por el mutante p53 en las células tumorales. La proteína p53 de tipo natural se enlaza con dos copias de la secuencia de consenso 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GpyPyPy-3' (SEQ ID NO. 1) y de esta manera transactiva el nivel de transcripción de un promotor unido operativamente. La mayoría de las mutaciones en el gen p53 llevan a la derogación de la función activante transcripcional específica a la secuencia.

La producción de la toxina puede controlarse mediante un promotor la función del cual esté suprimida mediante la proteína p53 de tipo natural en las células normales, pero que no esté suprimida o incluso esté sobre-regulada por la proteína mutante p53, por ejemplo el promotor hsp70, promotor mdm2 y otros. Ver, por ejemplo “The Oncogene and Tumour Suppressor Gene Facts Book”, Robin Hesketh, Academic Press, Second Edition (1997) capítulo p53, páginas 446-463 y sus referencias.

Los promotores de varios genes celulares están regulados negativamente por p53 de tipo natural, incluyen FGF básico (también activado por el mutante p53), Bcl-2, interleuquina humana 6 y PCNA. De nuevo, como ejemplos vease “The Oncogene and Tumour Suppressor Gene Facts Book”, Robin Hesketh, Academic Press, Second Edition (1997) capítulo p53, páginas 446-463 y sus referencias. Los promotores virales inhibidos por p53 de tipo natural y en algunos casos activados por versiones mutantes están descritos en Deb *et al.* (1992) *J. Virology*, 66 (10):6164-6170.

Así, dicho promotor o un punto de unión de p53 de tipo natural para tal promotor puede estar unido operativamente a ácido nucleico que codifica la toxina. En células normales la proteína p53 de tipo natural suprime la producción de

la toxina. Sin embargo, la producción de la toxina no se reprime en tumores donde p53 no es funcional y no se enlaza a su punto de unión en el promotor.

De manera similar, se puede usar un elemento de respuesta que esté activado por p53 mutante pero no por el tipo natural, tales como los provenientes de las secuencias ADN HIV1-LTR, para proporcionar la sobre-regulación de la toxina en células tumorales, o la infra-regulación del antídoto cuando se use un tercer componente para controlar la producción del antídoto en células tumorales. Se puede usar un elemento activado por el elemento p53 mutante (por ejemplo) para sobre-regular un ARN antisentido, ribozima u otro factor que infra-regule la producción de antídoto en células tumorales.

La producción de toxina en las células no diana puede inhibirse mediante la utilización apropiada de ácido nucleico para influir en la expresión mediante regulación antisentido. Tales aproximaciones pueden usarse para disminuir la regulación de la producción de antídoto en las células diana. Ahora está bien establecido el uso de genes antisentido o de secuencias génicas parciales para disminuir la regulación de la expresión génica. El ADN de cadena doble se dispone en "orientación inversa" bajo el control de un promotor de manera que la transcripción de la cadena antisentido del ADN genere ARN complementario al ARNm normal transcrito a partir de la cadena sentido del gen diana. Se supone que la secuencia de ARN antisentido complementaria se une a continuación con ARNm para formar una cadena doble, inhibiendo la traducción del ARNm endógeno desde el gen diana a la proteína. Todavía no se conoce si este es el mecanismo de acción real. Sin embargo, es un hecho probado que la técnica da resultado.

Otra posibilidad es que el ácido nucleico sea utilizado donde la transcripción genera un ribozima, permitiendo cortar el ácido nucleico en un sitio específico - siendo así también útil para influir en la expresión génica. El estado de la técnica incluye referencias sobre ribozimas como Kashani-Sabet y Scanlon (1995). *Cancer Gene Therapy*, 2, (3) 213-223, y Mercola y Cohen (1995). *Cancer Gene Therapy* 2, (1) 47-59.

Así, un ARN antisentido o ribozima dirigido contra la expresión de la toxina puede usarse para infra-regular la producción en células no diana. La producción de ARN antisentido o ribozima puede ponerse bajo control de un promotor regulable de manera que se pueda disminuir dicha producción en las células diana (por ejemplo mediante un elemento p53 tal como se describe arriba).

Además de la regulación de la producción de antídoto o en vez de ella, puede utilizarse una aproximación a la infra-regulación de la producción de toxina en células no diana (por ejemplo, células normales), y/o a la sobre-regulación de la producción de toxina en las células diana (por ejemplo, células tumorales).

Otra posibilidad es usar ARN antisentido o un ribozima u otra aproximación para infra-regular la producción de antídoto en las células diana. La sobre-regulación de la producción en las células diana de un ARN antisentido o de un ribozima contra el antídoto puede utilizarse para reducir los niveles de antídoto en las células diana y de esta manera incrementar la actividad de la toxina en esas células.

El control de la traducción puede emplearse, por ejemplo mediante la secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES) que puede estar controlada mediante ARN de levadura (Das, *et al.* (1996), *J. Virol.*, 70(3):1624-32; Das, *et al.* (1998), *J. Virol.*, 72 (7):6638-47; Das, *et al.* (1998), *Front Biosci.*, 1:3:D1241-52; Venkatosan, *et al.* (1999), *Nucleic Acids Res.* 15:27 (2):562-72) u otros que inhiben la unión del ribosoma en el IRES.

En realizaciones adicionales, el sistema de muerte, la toxina y/o el antídoto u otro inhibidor se proporciona a las células como proteína, por ejemplo mediante la inyección directa en las células diana, como por ejemplo en un tumor. En una realización, se utiliza una molécula portadora para facilitar la entrada a las células, por ejemplo una secuencia peptídica de 16 aa derivada del homeodominio de Antennapedia (por ejemplo, en la forma comercial conocida como "Penetratin"), que puede unirse a un péptido mediante un residuo terminal Cys. La molécula "Penetratin" y sus propiedades se describen en el documento WO 91/18981. Otro ejemplo es VP22 (Elliott y O'Hare (1999) *Gene Ther* 6 (1):149-51; Dilber *et al.* (1999) *Gene Ther* 6(1):12-21; Phelan *et al.* (1998) *Nat Biotechnol* 16 (5):440-3).

La expresión y la purificación de un antídoto de toxina son sencillas. Sin embargo, la naturaleza tóxica de una toxina como la proteína Kid la hace más complicada de sobre-expresar y purificar. Sin embargo, hay estrategias apropiadas disponibles o pueden desarrollarse por los expertos en la materia. En referencia a Kis/Kid, en ausencia de una base genética resistente a Kid, el antídoto Kis puede co-expresarse simultáneamente en las cepas sobreproductoras de Kid. La íntima interacción que se da entre ambas proteínas para generar un complejo neutralizado permite la purificación y separación de los componentes a partir de un extracto bacteriano completo seguido de la desnaturalización caotrópica y de una purificación cromatográfica adicional y renaturalización del componente tóxico. Se ha diseñado una aproximación basada en la cromatografía de una o dos afinidades bacterianas para purificar Kid y las variantes de Kid en grandes cantidades y se ha estandarizado un protocolo de replegado para obtener preparaciones de toxina de sistema ParD puras, activas y concentradas. Ver los experimentos descritos más adelante. Tales aproximaciones pueden utilizarse para purificar otros componentes tóxicos de diferentes sistemas de estabilidad.

Una composición que comprende ácido nucleico, proteína o células según la presente invención puede comprender al menos un componente adicional, tal como un diluyente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, o un disolvente o portador para la aplicación en el organismo diana, por ejemplo, una planta. Los ácidos nucleicos, proteínas, células y composiciones descritos en el presente documento pueden utilizarse en un método de tratamiento

del cuerpo humano o animal como terapia, por ejemplo para el tratamiento de tumores, cáncer, soriasis, arteriosclerosis, otros desórdenes hiperproliferativos, u otros desórdenes. Los ácidos nucleicos, proteínas, células y composiciones también pueden utilizarse en la fabricación de un medicamento para dichos tratamientos, y métodos de tratamiento que comprenden la administración de un medicamento o composición farmacéutica a una eucariota. Los métodos pueden comprender tratar células eucariotas con el ácido nucleico, la proteína, las células o las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, las células eucariotas pueden ser de cualquier levadura, mamífero, planta, anfibio, ave, pez o gusano. Las células a tratar pueden ser *in vitro* o en cultivo, o pueden estar comprendidas en el cuerpo de un mamífero (por ejemplo un humano) o planta o parte de planta (por ejemplo fruto, hoja, semilla u otros propágulos).

Las composiciones, células y métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse en métodos en los que la expresión de un gen deseado se dirige a las células deseadas, por ejemplo células tumorales en contraposición a células no tumorales. Tales métodos pueden llevarse a cabo *in vivo* (por ejemplo, en el tratamiento de un cuerpo humano o animal para fines terapéuticos), *ex vivo* (por ejemplo en células retiradas de un cuerpo humano o animal, previamente a la reposición de las células en el cuerpo) o *in vitro*. Las composiciones y células pueden utilizarse en la fabricación de un medicamento para tratamientos en los que la expresión de un gen deseado se dirige a células diana (por ejemplo células tumorales). Los constructos de ácidos nucleicos pueden formar parte de un vector viral, por ejemplo un vector viral diseñado para ser apropiado para su administración a un individuo, tal como un humano, y preferiblemente de manera adicional dirigido a un tumor.

Las composiciones proporcionadas pueden administrarse a individuos. Preferiblemente la administración será de “cantidades terapéuticamente efectivas”, siendo la suficiente para mostrar efectos beneficiosos en el paciente. Tales efectos beneficiosos pueden ser al menos la mejoría de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y los regímenes de administración, dependerán de la naturaleza y la severidad de la condición tratada. La prescripción del tratamiento, por ejemplo las decisiones en relación a la dosis, etc., serán responsabilidad del médico en general y otros doctores en medicina.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente o secuencialmente dependiendo de la condición que vaya a ser tratada.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden comprender, además de ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, portador, tampón, estabilizante u otros materiales conocidos por el experto en la materia. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza concreta del portador o de los otros materiales dependerá de la vía de administración.

El soporte experimental a la presente invención se describe a continuación a modo de ilustración. El experto en la materia extraerá varios aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención.

En el presente documento “comprende” se utiliza en el sentido de “incluye” lo que permite la presencia de uno o más componentes o características adicionales EJEMPLO 1 Efecto de la expresión del sistema parD en *Saccharomyces cerevisiae*.

Se probaron varios plásmidos con diferentes promotores constitutivos y/o regulables para comprobar su capacidad de expresar ambos componentes del sistema parD por separado de manera controlada. Los resultados fueron similares con todos los promotores utilizados. Adicionalmente a los promotores utilizados como se describe en detalle en los siguientes experimentos, los inventores llevaron a cabo experimentos utilizando el promotor ADH5 (constitutivo; Mumberg, *et al.* (1995), *Gene*, 14:156 (1):119.22) para *kis* y GAL10-CYC1 (galactosa activable Guarente, *et al.* (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 (23):7410-4) para *kid*.

La transcripción del antídoto en *S. cerevisiae* se controló mediante un promotor inducido por Cu²⁺, mientras la transcripción de la toxina se controló mediante un promotor diferente reprimido por metionina. Con este propósito, el primero se clonó en un plásmido monocopia (ARSH4/CEN6 origen de replicación) y el último se clonó en un plásmido multicopia (2 μ origen de replicación) que confiere a una levadura transfectada auxotrofia para leucina y triptófano respectivamente (Figure 1).

Usar un plásmido multicopia para la expresión de la toxina tiene dos ventajas: primero, se reduce la posibilidad de seleccionar células que han inactivado esa proteína por mutación de su ADN, ya que cada célula debería haber inactivado todas las copias (10-30 moléculas por genoma haploide en un plásmido receptor de origen 2 μ) del gen *kid* presentes en cada célula. La mutación de este gen en condiciones de crecimiento en las que el sistema está inactivado mediante la expresión del antídoto es tan poco probable como en la situación en la que no se fuerza selectivamente a las células a acumular mutaciones. Esto se verifica por el hecho de que la inducción del sistema ejerce un efecto claro de inhibición sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* (ver más adelante). Segundo, esta aproximación mostró que también es posible regular la cantidad de ARNm de cada componente del sistema mediante el incremento o la disminución del número de moléculas de ADN codificantes para cada uno (es decir su número de copia) sin modificar la fuerza de sus promotores. Esto permite una mayor flexibilidad en el diseño de sistemas en eucariotas, por ejemplo para levaduras, antihongos, etc.

Se cultivaron diferentes cepas de *S. cerevisiae* transfectadas con plásmidos *kis+/kid+*, *kis+/kid-* o *kis-/kid-* en medio líquido selectivo (-Leu/-Trp) en presencia de cantidades de Cu^{2+} y metionina que mantuvieron el sistema *parD* en un estado inactivo, antes de poner en los platos diferentes series de soluciones de estos cultivos en medio sólido con una cantidad constante de metionina para dar una expresión constante de *kid* (si la había) en todos los casos, pero con concentraciones reducidas de Cu^{2+} para disminuir la expresión de su antídoto de plato a plato. No se permitió que las células portadoras de *kis* y *kid* crecieran en el medio sin Cu^{2+} y este efecto disminuyó al aumentar la concentración de Cu^{2+} hasta que alcanzó aproximadamente la misma velocidad de crecimiento que las células naturales (*kis-/kid-*). En contraste, tanto a las células *kis+/kid-* como a las naturales (*kis-/kid-*) se les permitió crecer normalmente bajo todas las condiciones ensayadas.

Este experimento demostró que *kid* y *kis* son activos como toxina y como su antídoto respectivamente en levaduras y que es posible regular su actividad (y así la activación o inactivación de *parD*) mediante el control transcripcional de sus componentes en *S. cerevisiae*. También proporciona una indicación de que la expresión del antídoto por sí sola no tiene efectos secundarios y que el proceso biológico inhibido por la toxina *parD* se conserva entre organismos alejados evolutivamente.

Ejemplo 2

Efecto de las proteínas del sistema parD en Xenopus laevis

Se inyectaron dos embriones de *Xenopus laevis* en estadio celular en el polo animal de uno de los blastómeros bien con *kis*, *kid*, ambas o ninguna de ellas (blanco) y se siguieron a lo largo del tiempo sus efectos en las siguientes divisiones celulares. Los embriones inyectados con *kid* sólo se dividieron correctamente en el blastómero no inyectado, mientras que los blastómeros de los embriones inyectados con *kis-*, *kis/kid-* y blanco en todos los casos progresaron a través de las etapas de desarrollo embrionario que se siguieron en el ensayo de la misma manera que los no inyectados (al menos hasta la transición media de blástula, MBT).

Este experimento además indica que la progresión del ciclo celular está muy influida por la proteína *Kid* no neutralizada y sugiere que este efecto no se da en ninguna de sus fases gap (*G1* o *G2*) ya que no están presentes en las primeras fases de desarrollo de *X. laevis*. También confirma que afecta a un proceso biológico conservado en especies evolutivamente alejadas y ofrece algunas claves en relación con el posible mecanismo de acción de *kid* (ya que la replicación embrionaria de *Kid* no necesita secuencias específicas de ADN para iniciarse). El hecho de que la progresión del ciclo celular de los blastómeros no inyectados en los embriones inyectados con *kid* no se vea afectada en absoluto, junto con la falta de efectos en ambas mitades de los otros embriones inyectados (*Kis*, *Kis/Kid* y blanco), claramente indica que el producto del gen *Kid* es el responsable de ese fenotipo en eucariotas y que el producto del gen *Kis* es responsable de su neutralización y no tiene efectos secundarios por sí cuando se utiliza solo.

Ejemplo 3

Efecto del sistema parD en células humanas

Los resultados anteriores a partir de levadura y anfibios muestran que *Kid* puede impedir la progresión del ciclo celular en eucariotas de una manera controlada y que es posible que en esos organismos se sustituyan los circuitos procariotas de regulación que mantienen el sistema *parD* en estado latente bajo las condiciones deseadas mediante la modulación de la transcripción del antídoto y de la toxina con diferentes promotores.

Para los experimentos en células humanas se construyó un grupo de plásmidos denominados pNATHA (para plásmidos con actividad neutralizable que provocan la apoptosis HeLa, "Neutralisable Activity that Triggers HeLa Apoptosis"). Su mecanismo de acción se basa en la observación de que en las células HeLa Tet Off un promotor temprano de Cytomegalovirus (CMV Pr) mantiene un nivel constante de transcripción de un gen reportero independientemente de la presencia o ausencia de tetraciclina (o doxiciclina) en el medio de cultivo. Por otro lado, utilizando la misma línea celular, un promotor regulable mediante tetraciclina (Tet Pr) puede disminuir el nivel de transcripción de dicho gen reportero más de tres órdenes de magnitud al añadir el regulador transcripcional. En el estado inducido (es decir, en ausencia de Dox) la transcripción del gen reportero dirigida por Tet Pr es casi dos órdenes de magnitud mayor que la del mismo gen reportero bajo control de CMV Pr. En el estado no inducido (es decir, en presencia de Dox), los últimos transcriben casi dos órdenes de magnitud más eficientemente que los primeros (Figura 2).

Este comportamiento transcripcional ofrece una ventana que puede utilizarse para construir los plásmidos pNATHA, en los que tanto los genes *kis* y *kid* están contenidos en la misma molécula de ADN, la síntesis de ARNm del antídoto controlada por el promotor reprimible Tet y los niveles de mensajero de la toxina controlados por el CMV constitutivo. Se clonaron ambos *Kis* y *Kid* contenidos en los casetes o en orientación directa o invertida (Figura 5). La toxina y el antídoto pueden clonarse en una orientación cola a cola o cola a cabeza cuando convenga y aprovechar la interferencia transcripcional bajo el control apropiado. Ambos pueden formar parte de la misma unidad transcripcional si se pone un IRES entre las secuencias codificadoras.

Se ensayaron en células HeLa otras variantes tanto del antídoto como de la toxina, después de verificar su actividad de tipo natural *in vivo* en *E. coli*. Se fusionó una señal de localización nuclear (NLS) en *Kid* y *Kis* para probar si esto

conferiría un efecto más eficiente (si lo hay en células humanas) tanto impidiendo el progreso del ciclo celular como neutralizando dicho impedimento, respectivamente.

Todos los pNATHA se transfectaron establemente en una línea celular HeLa Tet Off. El efecto *in vivo* de ambos componentes del sistema parD en estas células se analizó antes y después de la adición de doxíciclina a los diferentes cultivos. La primera observación de este grupo de experimentos es que, de nuevo, después de la inducción del sistema, la velocidad de crecimiento celular se inhibió intensamente en las células HeLa kis+/kid+ y nlskis+/kidnls+. Esto sugiere dos cosas diferentes: Primero, que el transporte inmediato de la toxina en el núcleo (verificado mediante la microscopía confocal de muestras de Kid inmunoteñidas) no impide su efecto tóxico, indicando la localización nuclear probable de su(s) diana(s) celular(es); y segundo, que los componentes naturales del sistema parD son tan activos como los fusionados en NLS- en las células HeLa, que indican si bien esa entrada al núcleo no está impedida para las proteínas de tipo natural, y/o que la inactivación de la(s) diana(s) celular(es) mediante Kid puede darse en el citosol. Después de uno o dos días creciendo en presencia de doxíciclina, y hasta los diez días de tratamiento, es detectable un estado inducido de parD, como si las células kis+/kid+ hubieran incrementado el tiempo de duplicación, comparado con los transfectantes kis+/kid- o con las células kis+/kid+ crecidas en ausencia de doxíciclina (Figura 4). Debería recalarse que como sólo la transcripción de kis se modula directamente, mientras se mantiene un nivel constante de kid, la velocidad de crecimiento para aquellos transfectantes estabilizados kis+/kid+ es inferior que la de sus correspondientes kis+/kid- en las mismas condiciones. Esto puede darse a causa de una ligera fuga del sistema al nivel de su capacidad de neutralización si la transcripción de kid no se reduce de manera selectiva a la vez.

Los resultados mostraron una reducción progresiva de las duplicaciones celulares de los transfectantes estables kis+/kid+ bajo la exposición continuada a doxíciclina (es decir a toxina no neutralizada). Los inventores se interesaron en si pudiera ser posible proporcionar un efecto citostático y/o citotóxico.

El porcentaje de células muertas se determinó después del tratamiento con dosis sub-letales de doxíciclina de los diferentes transfectantes estables analizados previamente. Como se ha indicado anteriormente, las células kis+/kid- HeLa mostraron una velocidad de crecimiento celular exponencial respecto al tiempo tanto en presencia como en ausencia de doxíciclina. Por el contrario, las células kis+/kid+ HeLa mostraron una velocidad de crecimiento celular exponencial sólo cuando se mantuvo la transcripción del antídoto (es decir, en ausencia de doxíciclina) pero no en el caso contrario, en el que redujeron continuamente su número de duplicaciones (Figura 5). Debe recalarse que la velocidad de crecimiento se redujo para las células kis+/kid- HeLa cultivadas en presencia de doxíciclina en comparación con aquellas de la misma línea celular estable en su ausencia. Este efecto puede deberse a una larga exposición a doxíciclina incluso a dosis sub-letales y, en cualquier caso, no lleva a la muerte celular. Cuando se contaron las células muertas en todas las muestras, las células kis+/kid+ HeLa cultivadas en presencia de doxíciclina (es decir, en presencia de toxina no neutralizada) mostraron un 32% y 65% de células muertas en los días cinco y diez del tratamiento, respectivamente, mientras todas las demás muestras no mostraron más del 9% incluso después de 10 días de tratamiento (Figura 5). El teñido con Annexin V (es decir, un marcador apoptótico temprano) de las diferentes muestras analizadas, demostró que la muerte celular observada en la línea celular no neutralizada HeLa fue debida a la activación de la apoptosis (Figura 6).

Materiales y métodos

Plásmidos Saccharomyces cerevisiae

Se utilizaron los oligonucleótidos XhoIKis (5'CCGCTCGAGATGCATACCCGACTG3' - SEQ ID NO. 2) y Kis-NcoI (5'CATGCCATGGTCAGATTTCCTCCTGACCAG3' - SEQ ID NO. 3) para amplificar la región de codificación de kis mediante PCR a partir de un derivado mini-R1. El producto amplificado se dirigió con XhoI y NcoI y se clonó en el plásmido pSAL1 para construir pSAL1Kis (Mascorro-Gallardo, *et al.* (1996), Gene, 172 (1):169-70). De manera similar, los oligonucleótidos ATGKid (5'ATGGAAAGAGGGGAAATCTG3' - SEQ ID NO. 4) y KidEcoRI (5'CGGAATTCCCCATGTTCAAGTC3' - SEQ ID NO. 5) se utilizaron para amplificar la región de codificación kid utilizando la misma plantilla y el producto obtenido se dirigió con EcoRI y se clonó en el plásmido p424Met25 (Mumberg, *et al.* (1994), Nucleic Acids Res., 25:22 (25):5767-8) digerido con SmaI y EcoRI para construir el plásmido p424Met25Kid. Este plásmido se amplificó en una cepa bacteriana que sobre-producía Kis al mismo tiempo que eliminaba la selección de mutantes inactivados durante el proceso de clonación.

Ensayo in vivo

La cepa W303α de *Saccharomyces cerevisiae* (MAT α, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, 112, his3-11, ura3, psi+) se transformó con plásmidos pSAL1 y p424Met25 (ninguno), pSAL1Kis y p424Met25 (kis+/kid-) y pSAL1Kis y p424Met25kid (kis+/kid+). Estas células se cultivaron en un medio selectivo suplementado con 500 μM de metionina y 200 μM de CuSO₄ para mantener a los promotores kis y kid en un estado activado y reprimido, respectivamente. Se permitió que los cultivos crecieran hasta la fase media de crecimiento y a continuación se dispuso una gota de 3 μl de disoluciones de cada cultivo que contenían 15000, 1500 o 150 células en platos de agar con medio selectivo suplementado con 200 μM de metionina para mantener un nivel de expresión constante del gen kid y 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 μM de CuSO₄ para incrementar el nivel de expresión del gen kis. Los platos se incubaron 48 horas a 30°C y la velocidad de crecimiento de cada cultivo se analizó *a posteriori* en cada plato.

*Xenopus laevis**Sobreproductores de Kis y Kid**Sobreproductor MBPKis*

Se utilizaron los oligonucleotidos ATGKis (5'ATGCATACCACCCGACTG3' - SEQ ID NO. 6) y KisEcoRI (5'TC GGAATTCAGATTCCTCCTG3' - SEQ ID NO. 7) para amplificar kis mediante PCR utilizando un plásmido mini-R1 como plantilla. El producto amplificado se digirió con EcoRI y se clonó en el plásmido pMAL-c2 (Mumberg, *et al.* (1994), Nucleic Acids Res., 25:22(25):5767-8) entre los sitios XmnI y EcoRI para obtener el sobreproductor MBP-(Proteína de unión a maltosa) Kis.

Sobreproductor HisKisKid

Se utilizaron oligonucleotidos NdeIkid (5'GGAATTCCATATGCATACCACCCGACT3' - SEQ ID NO. 8) y kis-BamHI (5'CGGGATCCTCAAGTCAGAATAGT3' - SEQ ID NO. 9) para amplificar en tándem las regiones codificantes de kis y kid a partir de un derivado mini-R1. El producto de la PCR se digirió con NdeI y BamHI y se clonó en pET15b (Invitrogen) entre estos sitios. El plásmido resultante se digirió con NcoI y BamHI y el fragmento de ADN que codifica Hiskiskid se purificó y se subclonó entre estos mismos lugares en pRG-recANHis (Giraldo, *et al.* (1998), EMBO J., 3:17 (15):4511-26).

*Purificación de proteína**Purificación MBPKis*

Se purificó la proteína Kis en forma de fusión con la proteína de unión de maltosa (MBP). La cepa DH5a de *Escherichia* transformada con el plásmido pMBPKis se inoculó en 2 L de medio LB más ampicilina (100 µg/ml) a 0,04 unidades de 600 nm de Abs y se cultivó con agitación a 37°C hasta que se alcanzaron 0,4 unidades de 600 nm. La expresión de MBPKis se indujo a continuación mediante la adición de 100 µM de IPTG al medio de cultivo. Las células se cultivaron durante 4 horas a 37°C y a continuación se peletizaron en un rotor GS3 y se resuspendieron en 10 ml de tampón lítico (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) y se congelaron en nitrógeno líquido. Después de descongelar las células, se añadieron 2 mg de lisozimas a la suspensión de células y se completó la lisis mediante la incubación a 37°C durante aproximadamente 10 minutos, enfriandola en hielo cada 3 minutos. Se obtuvo una fracción soluble mediante la adición de 40 ml de tampón 20 mM en Tris-HCl, pH 8,0, 600 mM NaCl y centrifugación a 30 Krpm a 4°C durante 45 min en un rotor 65 Ti. La proteína MBPKis se purificó mediante cromatografía de afinidad a través de una resina de amilosa (BioLabs) siguiendo las instrucciones del fabricante con tampón 20 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM DTT y 10% de etilenglicol. Las fracciones MBPKis se juntaron y se determinó la pureza y la concentración de la proteína mediante tinción de coomassie en un gel SDS-PAGE y mediante análisis espectrofotométrico, respectivamente. Las fracciones se almacenaron a -80°C.

Purificación de Kid

Se cultivaron las cepas C600 o TG1 de *Escherichia coli* transformadas con el sobreproductor pRGDHisKisKid en 2 L de medio LB más ampicilina (100 µg/ml) a 0,04 unidades de 600 nm de Abs, y se cultivó con agitación a 37°C hasta que se alcanzaron 0,4 unidades de 600 nm. A continuación se indujo la expresión de HisKis y Kid mediante la adición de 25 µg/ml de ácido nalidíxico al medio de cultivo. Las células se cultivaron durante 4 horas a 37°C y a continuación se peletizaron en un rotor GS3 y se resuspendieron en 10 ml de tampón lítico (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) y se congelaron en nitrógeno líquido. Después de la descongelación, se añadieron 2 mg de lisozimas a la suspensión de células y se completó la lisis mediante la incubación a 37°C. Se obtuvo una fracción soluble mediante la adición de 40 ml de tampón 20 mM en Tris-HCl, pH 8,0, 600 mM NaCl y centrifugación a 30 Krpm a 4°C durante 15 min en un rotor 65 Ty. Esta fracción soluble se precipitó mediante la adición de un 60% de sulfato de amonio y centrifugación a 40 Krpm a 4°C durante 60 min. La fracción precipitada se resuspendió en 1 ml de 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM KCl y se dializó contra el mismo tampón para eliminar el sulfato de amonio. La fracción dializada se cargó en 5ml de sefara 6 que elute de flujo rápido (Pharmacia) activada con Ni²⁺ y equilibrada con el tampón de diálisis en el que se retuvo el complejo HisKis-Kid. Se aplicó un gradiente de 0 a 6 M de cloruro de guanidina (GnCl) en 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 a la columna y la desnaturalización del complejo HisKis-Kid unido a la columna llevó a la retención de HisKid y la elución de Kid a 5,5 M con agente caotrópico. El Kid desnaturalizado puede almacenarse a -80°C hasta su utilización. Para la renaturalización, se diluyó Kid a 5 µmol/µl en 6 M GnCl, 150 mM ClK, 100 mM de tampón de fosfato a pH 6,5, 20 mM en β-mercaptoetanol, 0,2 mM en EDTA y 1,2% en CHAPS y se dializó 5 veces durante 6 horas a 4°C contra 200 ml (por 6 ml de proteína) de 100 mM de tampón de fosfato pH 6,5, 150 mM KCl, 10 mM en β-mercaptoetanol, 0,1 mM en DTT y 10% en etilenglicol. La proteína soluble y plegada se separó de la insoluble (desnaturalizada) mediante el centrifugado de la mezcla a 40 Krpm durante 60 min a 4°C en un rotor 65 Ty. El sobrenadante se concentró en tubos centricon (límite 3 K) y se alicuotaron después de determinar la pureza y la concentración de la proteína mediante tinción coomassie en un gel SDS-PAGE y análisis espectrofotométrico, respectivamente, y se almacenó a -80°C.

Microinyecciones embrionarias

Las proteínas MBPKis y Kid se dializaron contra tampón 20 mM Tri-HCl pH 8,0, 50 mM KCl y 2 μ l de MBPKid (160 ng/ μ l) y se mezclaron 2 μ l de MBPKis (720 ng/ μ l) con cada uno o con 2 μ l de tampón de diálisis y se incubaron en hielo durante 10 min. Se microinyectaron 50 nl of cada mezcla (tampón, Kis, Kid y Kis/Kid) en dos embriones celulares licuados de *Xenopus laevis* en el polo animal de una de sus células. A continuación los embriones microinyectados y no inyectados se incubaron en 4% de ficoll 400 en tampón MBS a 18°C y se permitió que progresaran a través del desarrollo embrionario hasta que alcanzaron la etapa 8-9 (blástula) en el caso de los controles no inyectados (7-8 horas). Entonces se fotografiaron los embriones y después se analizó el efecto de las microinyecciones.

Plásmidos celulares HeLa (pNATHAs)

Se utilizaron los oligonucleótidos EcoRIKis (5'CGGAATTCATGCATACTACCACCCGACTG3' - SEQ ID NO. 10) o EcoRINLSKis (5'CGGAATTCATGGACAAGGTTCCCTAAGAAGAAGAGGAAGGTTAGCAGCATGCA TACCACC CGACTGAAG3' - SEQ ID NO. 11) y KisXbaI (5'CTCTAGATCAGATTTCTCCTGACC3' - SEQ ID NO. 12) para amplificar kis mediante PCR utilizando un plásmido mini-R1 como plantilla. El producto amplificado se digirió con EcoRI y XbaI y se clonó en el plásmido pTRE (Clontech) entre los sitios EcoRI y XbaI para obtener los plásmidos pTREKis y pTRENLSKis, respectivamente. Por otro lado, los oligonucleótidos XhoIKid (5'CCGCTCGA GATGGAAAGAGGGGAAATCT3' - SEQ ID NO. 13) y KidEcoRI (SEQ ID NO. 5) se utilizaron para amplificar kid mediante PCR utilizando un plásmido mini-R1 como plantilla, y EcoRIKid (5'CGGAATTCATGGAAAGAGGG GAAATCT3' - SEQ ID NO. 14) y KidNLSXbaI (5'GCTCTAGATCAAACCTTCCTCTTCTTCTTAGGAGGCC TGCTGCTAGTCAGAATAGTGA CAGGCG3' - SEQ ID NO. 15) se utilizaron con el mismo objetivo para obtener un gen NLSKid mediante PCR utilizando un plásmido mini-R1 como plantilla. Estos dos productos de PCR se digirieron con XhoI y EcoRI o EcoRI y XbaI, respectivamente, y se clonaron entre esos sitios en el plásmido pCneo (Promega) para obtener los plásmidos pCneoKid y pCneoKidNLS. Esos plásmidos kid+ se amplificaron en una cepa bacteriana que sobreproduce Kis a la vez que elimina la selección de los mutantes inactivantes durante el proceso de clonación. El fragmento BsTXI-SmaI se seleccionó de pCneoKid y pCneoKidNLS para eliminar el gen de resistencia a la neomicina. Los plásmidos resultantes (pCIKid y pCIKidNLS) se digirieron con BgIII y BamHI y se trataron con Klenow, y el fragmento que contenía los genes kid o kidNLS se purificó y se clonó en los vectores pTRE y pTREKis digeridos con HindIII y se trataron con Klenow. Para cada una de estos constructos se seleccionaron ambas orientaciones, y se obtuvieron los plásmidos pNATHA1 (kis+), pNATHA2 (kis+/kid+), pNATHA4 (NLSkis+) y pNATHA8 (NLSkis+/ kidNLS+) tanto en las orientaciones kis-kid cola a cola (pNATHAi) y cola a cabeza (pNATHAd).

Selección de transfectantes estables

Se mezclaron 5 μ g de cada pNATHA con 0,5 μ g de plásmido pTKHyg y se transfectó la línea celular HeLa Tet-Off (Clontech) con esas mezclas mediante el método de la Lipofectamina (Gibco). Se seleccionaron los transfectantes estables en medio DMEM suplementado con glutamax y 10% de suero fetal bovino aprobado para tetraciclina (Clontech) y en la presencia de 200 μ g/ml de neomicina (Sigma) y 200 μ g/ml de higromicina (Clontech) (medio no tóxico; NTM).

*Ensayos in vivo**Determinación del crecimiento celular y de la velocidad de muerte*

Las células HeLa Tet Off establemente transfectadas con pNATHAi1+ y pNATHAi2+ se cultivaron en NTM hasta que alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia. Se tripsinizaron y 5 x 10⁴ células establemente transfectadas con pNATHAi1+ y 2 x 10⁴ de las células transfectadas establemente con pNATHAi2+ se transfirieron a 4 pocillos de una placa de 6 multipocillos y se cultivaron durante 24 horas en NTM. Después, se tripsinizó uno de los pocillos por muestra y sus células se peletizaron y se tiñeron con azul de tripano. Se contaron las células totales y las teñidas de azul (muertas) por pocillo con un citómetro. A continuación, se añadió 0,1 μ g/ml de doxiciclina (Sigma) al resto de pocillos y se permitió que las células crecieran en ese medio tóxico (TM) durante 2, 5 y 10 días, cambiándolo cada 4 días cuando fue necesario, pero manteniendo el flotante de células (muertas y mitóticas) cada vez que se añadía TM fresco. La tripsinación, la tinción con azul de tripano y el contado de células se repitió para cada muestra para determinar el número células muertas y totales por muestra.

Tinción anexina V

Las células HeLa Tet Off establemente transfectadas con pNATHA1+ y pNATHA2+ se cultivaron en NTM hasta que alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia. Se tripsinizaron y 10⁴ células establemente transfectadas con pNATHA1+ y 5 X 10⁴ de las células establemente transfectadas con pNATHA2+ se transfirieron a cuatro platos de 5 cm de diámetro en los que se pusieron cuatro films recubiertos de polilisina. Se dejó que las células se asentaran durante 24 h y a continuación se añadió 0,1 μ g/ml de doxiciclina (Sigma) a uno de los platos por muestra. Los films se sacaron antes (día 0) y 2, 5 y 10 días después de la adición de doxiciclina a uno de ellos. Se añadió medio fresco cada cuatro días cuando fue necesario. Las muestras cultivadas en los films se tiñeron con FITC-Annexin V (Clontech), como indica el fabricante, antes de fijarlas y se tiño el ADN con iodo de propidio y Hoerschts 33258. El análisis y el contado de las células positivas a Annexin V se hizo mediante microscopía confocal y se determinó el número de células apoptóticas y totales.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

(i) la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis, o

(ii) ácido nucleico que codifica la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis,

para su uso en un método terapéutico de inhibición de la proliferación celular y/o la progresión del ciclo celular llevado a cabo sobre un cuerpo humano o animal, comprendiendo el método proporcionar la toxina y la antitoxina a células eucariotas del cuerpo humano o animal, bajo control apropiado para la inhibición selectiva del ciclo celular y/o la muerte de células diana.

2. Composición según la reivindicación 1, donde dicha toxina es proporcionada a las células mediante un ácido nucleico que codifica la toxina bajo el control de elementos apropiados de control de la expresión.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en el método que comprende proporcionar a las células la toxina y la antitoxina, y controlar la actividad de dicha antitoxina sobre dicha toxina para controlar la actividad de dicha toxina en las células.

4. Composición según la reivindicación 3, donde la toxina es proporcionada a las células mediante un ácido nucleico que codifica la antitoxina bajo el control de elementos de control de la expresión apropiados.

5. Composición según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, donde la inhibición selectiva del ciclo celular y/o muerte está afectada por la combinación de (i) la sobre-regulación de la producción de toxina en las células diana, y (ii) la infra-regulación de la producción de toxinas en las células no diana y/o la neutralización de la actividad de la toxina en las células no diana.

6. Composición según la reivindicación 5, donde la neutralización de la actividad de la toxina en las células no diana está afectada por la sobre-regulación de la producción de antitoxina en las células no diana.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde dichas células diana son células tumorales.

8. Uso de una composición que comprende:

(i) la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis, o

(ii) ácido nucleico que codifica la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis,

en la fabricación de una composición medicamentosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el tratamiento de tumores, cáncer, soriasis, arteriosclerosis u otro tipo de desorden hiperproliferativo.

9. Procedimiento para la inhibición de la proliferación celular y/o la progresión del ciclo celular, comprendiendo el procedimiento proporcionar la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis a células eucariotas bajo control apropiado para la inhibición selectiva del ciclo celular y/o la muerte de las células diana, donde las células son *in vitro* y/o son células vegetales.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde dicha toxina es proporcionada a las células mediante un ácido nucleico que codifica la toxina bajo el control de elementos de control de expresión apropiados.

11. Procedimiento para la inhibición de la proliferación celular y/o la progresión del ciclo celular, comprendiendo el procedimiento proporcionar la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis a células eucariotas, donde las células son *in vitro* y/o son células vegetales.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende proporcionar a dichas células la toxina ParD kid y la antitoxina ParD kis, y controlar la actividad de dicha antitoxina sobre dicha toxina para controlar la actividad de la toxina en las células.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la antitoxina es proporcionada a dichas células mediante un ácido nucleico que codifica la antitoxina bajo el control de elementos de control de expresión apropiados.

14. Procedimiento según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, donde la selectividad de la expresión de dicha toxina en las células diana está afectada por la combinación de (i) la sobre-regulación de la producción de toxina en las células diana y (ii) la infra-regulación de la producción de toxina en las células no diana y/o la neutralización de la actividad de la toxina en las células no diana.

ES 2 295 037 T3

15. Procedimiento según la reivindicación 14, donde la neutralización de la actividad de la toxina en las células no diana está influida por la sobre-regulación de la producción de antitoxina en las células no diana.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde las células diana son células tumorales.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

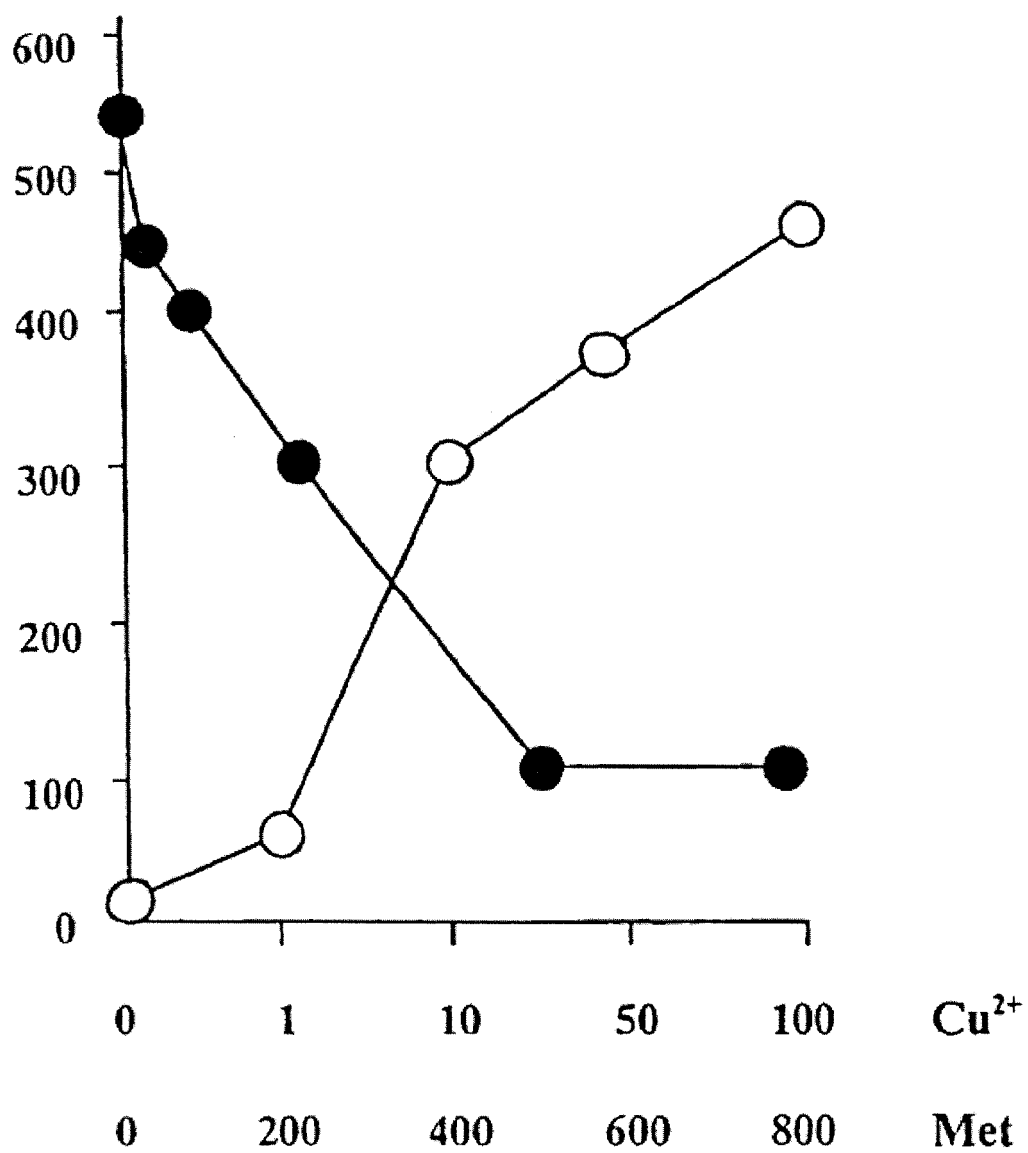


Figura 2

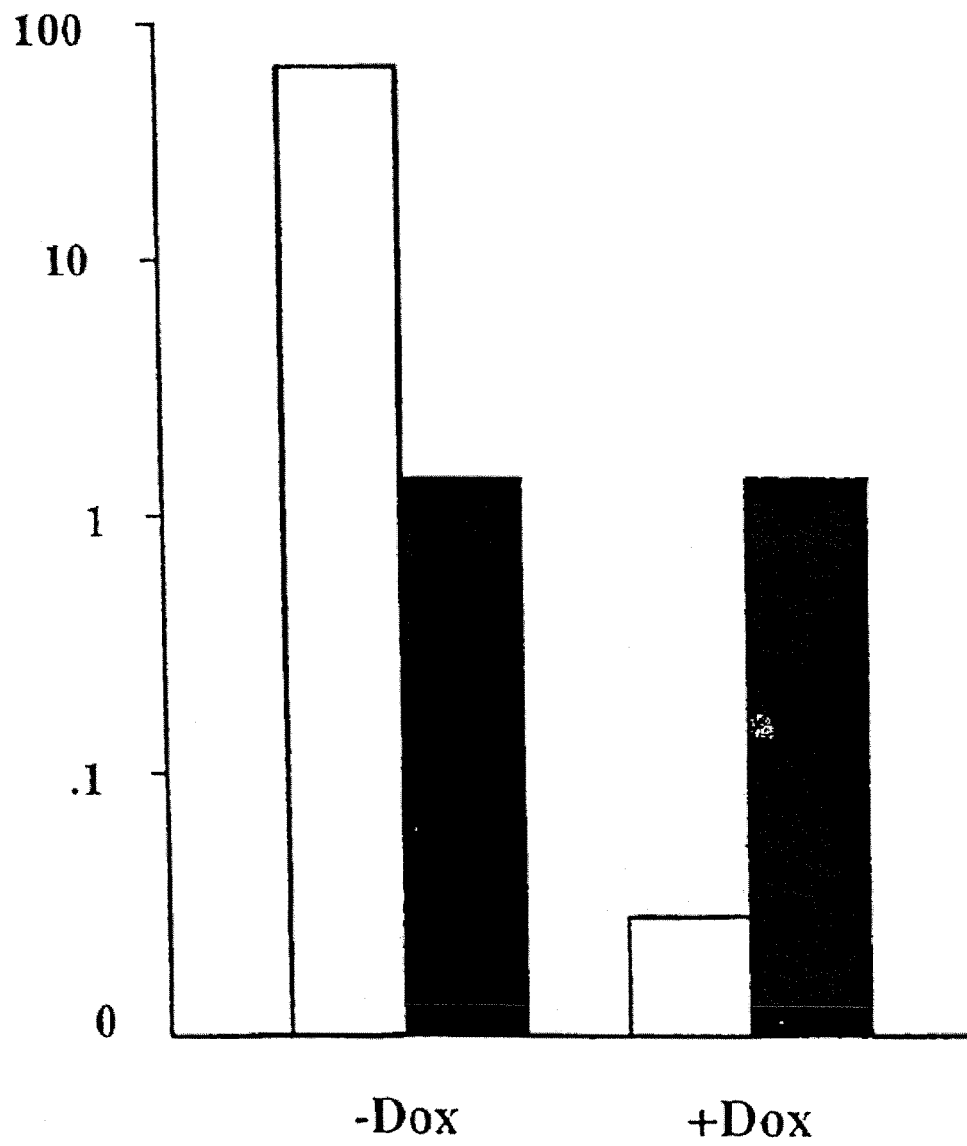


Figura 3

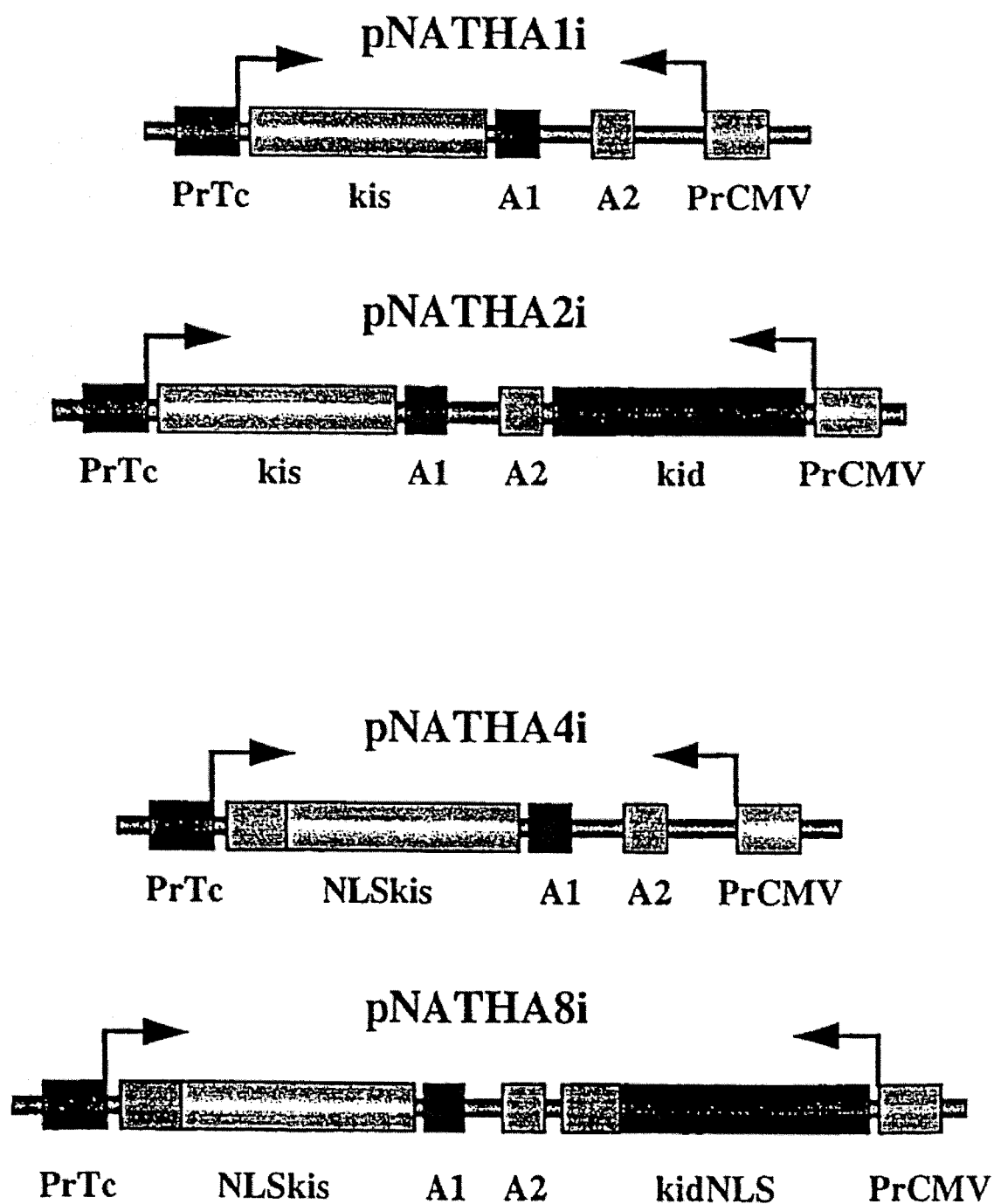


Figura 4

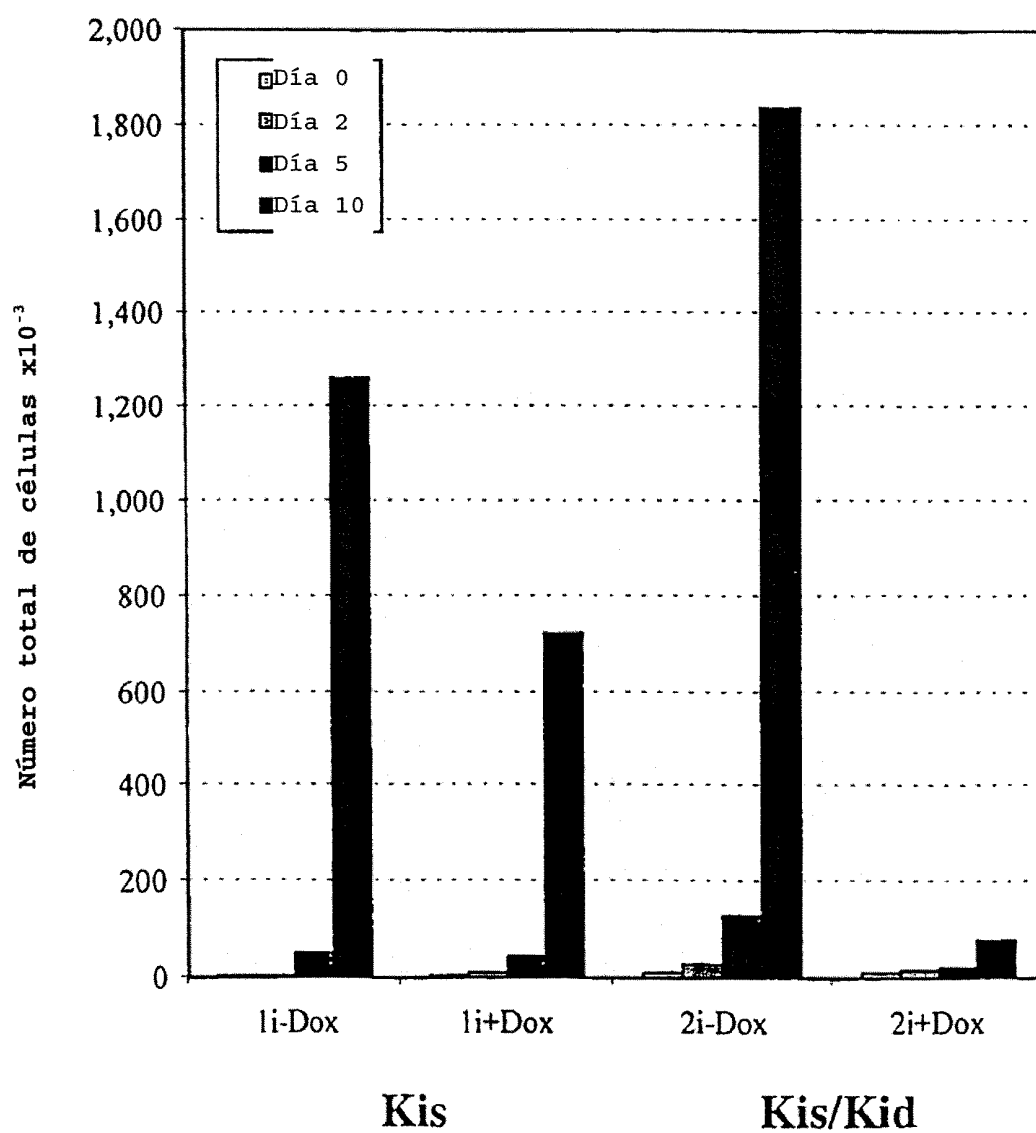


Figura 5

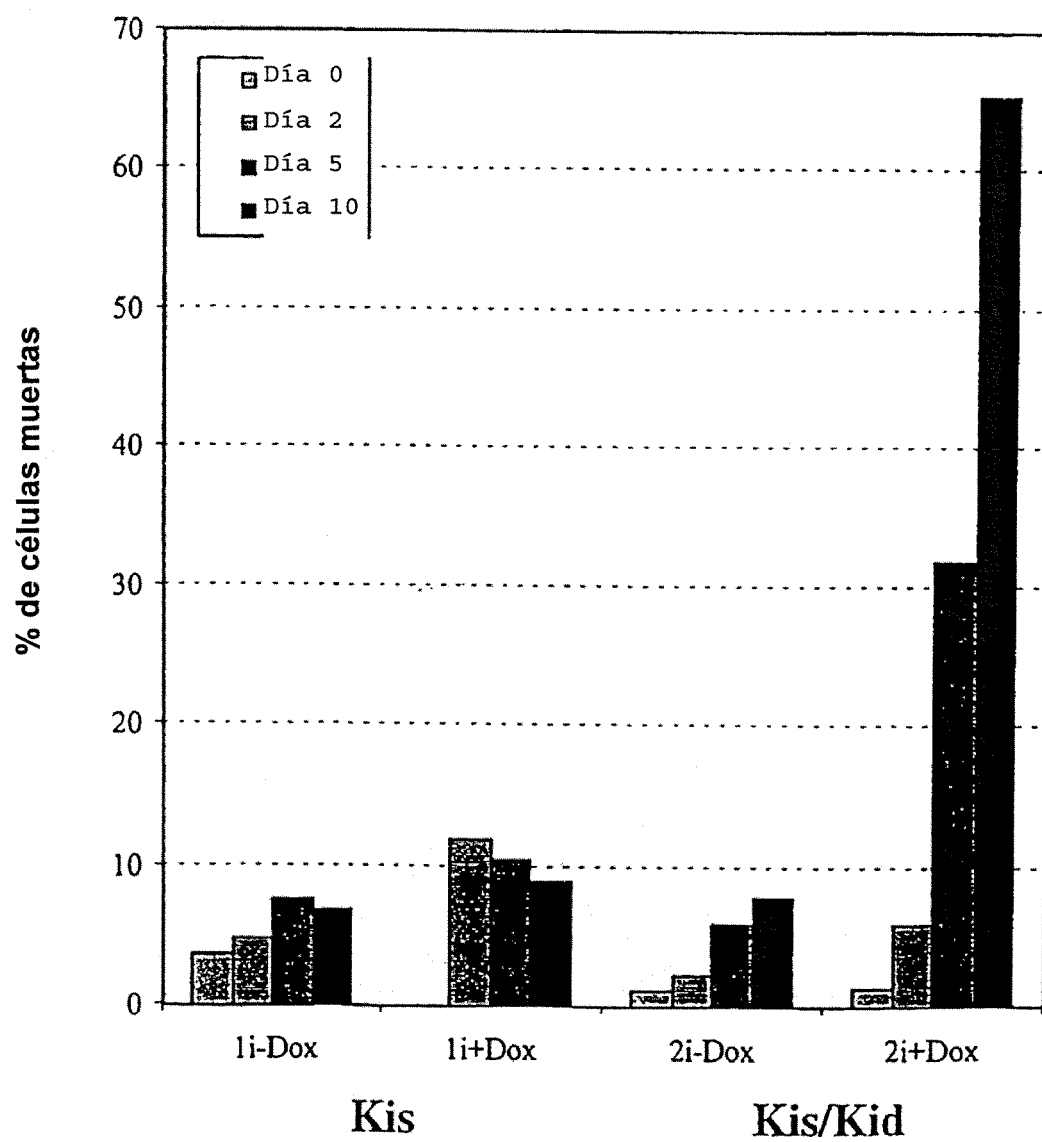


Figura 6

