

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 688**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12N 9/64** (2006.01)

**C12N 15/79** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2019** **PCT/EP2019/080485**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2020** **WO20094764**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2019** **E 19801284 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023** **EP 3884055**

54 Título: **Construcción génica suicida doble e inducible y su uso en terapia génica**

30 Prioridad:

**07.11.2018 EP 18382792**

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

**24.01.2024**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
C/ Serrano 117  
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**BACHILLER PÉREZ, DANIEL;  
FLEISCHER, AARNE y  
VALLEJO DIEZ, SARA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 957 688 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Construcción génica suicida doble e inducible y su uso en terapia génica

La presente invención se encuadra dentro del campo de la ingeniería genética y la terapia génica y celular, específicamente dentro de las construcciones génicas o casetes suicidas que comprenden genes inducibles desencadenantes de muerte celular en las células que los expresan. Dichas construcciones pueden por lo tanto ser empleadas para inducir muerte celular dirigida y específica en poblaciones celulares concretas cuya presencia supone un riesgo para el organismo. Así, dichas construcciones suicidas representan herramientas de seguridad genética en, por ejemplo, el tratamiento y/o prevención de enfermedades o condiciones tales como el cáncer, la enfermedad injerto contra huésped o el rechazo a trasplantes. Las referencias a los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia se deben interpretar como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

El empleo de terapias celulares en la práctica clínica lleva asociada una potencial toxicidad como consecuencia de la manipulación previa en cultivo de las células trasplantadas, las cuales, una vez transferidas al organismo receptor, pueden llegar a suponer un riesgo. Por ejemplo, el trasplante de células hematopoyéticas puede desencadenar la enfermedad injerto contra huésped y el trasplante de células madre puede llevar asociada una proliferación celular descontrolada llegando a generar tumores. Por ello, hay un considerable interés en desarrollar mecanismos de seguridad genética que puedan ser controlados y activados externamente, en caso de ser necesario, de manera que permitan eliminar selectivamente y de forma controlada, condicionada e inducida, las células trasplantadas en el caso de que éstas lleguen a suponer un problema de salud para el individuo.

Ya que el efecto de las células trasplantadas en terapias celulares puede ser prolongado en el tiempo o incluso indefinido, haciendo por tanto que la toxicidad derivada del tratamiento pueda ser repentina y/o progresiva, se necesitan mecanismos de seguridad que permitan eliminar estas células trasplantadas en caso de aparición de efectos adversos. En este sentido, se han conseguido eliminar selectivamente células transferidas a organismos mediante la activación exógena de mecanismos de seguridad celular expresados de forma recombinante en dichas células y conocidos como "genes suicidas".

Un gen suicida codifica una molécula que, tras su activación, desencadena la destrucción selectiva de las células trasplantadas que lo expresan, previniendo así el daño celular y/o tisular provocado por ellas. El gen suicida ideal sería, por tanto, aquel que asegura la eliminación irreversible de todas las células responsables de la toxicidad indeseada y cuyo efecto a su vez es inocuo para otras células que no son las células diana.

Esta estrategia terapéutica basada en el empleo de genes suicidas no solo es aplicable a casos de trasplantes, sino que se ha convertido también en un nuevo tratamiento de interés en terapia contra el cáncer. En particular, la terapia génica suicida en el tratamiento contra el cáncer consiste en transfectar el gen suicida a las células tumorales mediante vectores dirigidos de manera que se produce una enzima específica que se convierte en un producto citotóxico tras ser activada, lo que finalmente resulta en la muerte específica de las células tumorales.

En general, los genes suicidas se pueden clasificar en función de su mecanismo de acción en: genes que codifican una enzima que actuaría como una pro-droga, genes que codifican una molécula cuya activación depende de su estado dimerizado y genes que codifican una molécula activada por un anticuerpo monoclonal. El agente ideal para la activación de un gen suicida debería ser biológicamente inerte, tener una adecuada biodisponibilidad y perfiles de biodistribución y no presentar toxicidad intrínseca.

Durante los últimos años se han diseñado varias construcciones suicidas, de entre ellas las más destacadas son las basadas en el gen de la timidina kinasa (TK) del virus del herpes simplex (HSV-TK) o en la actividad apoptótica de la caspasa 9 de mamíferos. En ambos casos se trata de proteínas inocuas expresadas constitutivamente. Sin embargo, cuando a la caspasa 9 se le proporciona su activador específico o a la TK su sustrato, se desencadenan procesos que acaban con la muerte de las células que las expresan.

El gen de la HSV-TK se ha empleado como desencadenante de la cascada de muerte celular dirigida (Ciceri, F., *et al.*, 2009, *The lancet oncology*, 10(5): p. 489-500). Este sistema se basa en la introducción en las células del gen de la TK en formato de expresión constitutiva. El producto de la expresión del gen es inocuo a no ser que se les suministre a las células Ganciclovir (GCV), el sustrato de la enzima, cuya metabolización da lugar a un análogo de base. El compuesto se incorpora al ADN durante la fase replicativa, introduciendo errores de copia que acaban por limitar la viabilidad de la célula. Sin embargo, este sistema presenta una serie de inconvenientes que lo hacen inadecuado para su uso en clínica

ya que, como puede verse, por un lado el funcionamiento del mismo está limitado al periodo proliferativo de la vida celular. Además, en sus aplicaciones prácticas nunca ha conseguido acabar con la totalidad de las células que se pretendía eliminar (Xu, F., *et al.*, 2009, *Cancer gene therapy*, 16(9): p. 723-30). Por otro lado, aunque el empleo del sistema suicida HSV-TK/GCV puede ser aparentemente efectivo como mecanismo de seguridad en determinadas situaciones, como la enfermedad injerto contra huésped, presenta en general una serie de desventajas como son la potencial inmunogenicidad de la proteína vírica HSV-TK. Además, dicha enzima requiere para su activación de una droga, GCV, que es un agente farmacológico crucial para el tratamiento de una de las infecciones más comunes en situaciones de trasplante, la infección por citomegalovirus. Esto conduce a la eliminación indeseada de las poblaciones celulares transducidas cuando dicho agente farmacológico se emplea para el tratamiento de este virus (Traversari C, Marktel S, Magnani Z, *et al.*, 2007, *Blood*, 109:4708-4715). Por último, la muerte celular completa mediada por HSV-TK/GCV tarda días en producirse, por lo que es un mecanismo de seguridad lento.

Más recientemente ha aparecido un nuevo tipo de gen suicida basado en la actividad apoptótica de la caspasa 9 (Straathof, K.C., *et al.*, 2005, *Blood*, 105(11): p. 4247-54). La caspasa 9 se produce en las células como un monómero inactivo que pasa a estado funcional una vez que se ha dimerizado. En su estado natural la dimerización está sujeta al estado fisiológico de la célula. Sin embargo, para hacerla independiente de esta condición y colocarla bajo control externo, en los genes suicidas basados en la caspasa 9 se ha sustituido el dominio de dimerización propio del gen, *Caspase Recruitment Domain* (CARD), por una variante de la *FK506 Binding Protein* (FKBP12) que contiene la mutación F36V. Esta mutación hace que el dominio se dimerice en presencia de cualquiera de las moléculas sintéticas AP20187 (también llamada CID del inglés “chemical inducer of dimerization”) o AP1903 pero no responda al dimerizador endógeno, lo que le hace exclusivamente dependiente de la actuación desde el exterior. La adición de AP20187 induce la dimerización de la molécula híbrida FKBP12-caspasa 9, lo que activa a la caspasa 9 y pone en marcha la cascada apoptótica que en pocos minutos produce la muerte celular. Este sistema de la caspasa 9 inducible (también llamado iCaspasa o iCaspasa9) se ha probado *in vitro* e *in vivo* con resultados aparentemente mejores que los de la TK, pero sin conseguir tampoco eliminar de forma completa las células diana (Kemper, K., *et al.*, 2012, *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 17(5): p. 528-37).

Algunos documentos de patente, como WO2016113702 o US5631236, también recogen la aplicación del gen suicida HSV-TK como mecanismo de seguridad genética en terapia celular con células madre o en tumores sólidos, respectivamente. Por otro lado, documentos de patente como EP3021853A1 o US2015366954 describen la inducción de apoptosis selectiva mediante el gen suicida inducible iCaspasa9. Actualmente solo los dos sistemas HSV-TK/GCV e iCasp9/AP1903 han conseguido llegar a la fase de ensayos clínicos para aumentar la seguridad de la terapia celular en procesos hematológicos malignos.

Cuando las dos estrategias suicidas iCaspasa y TK se han comparado de forma directa en un mismo experimento ambas han mostrado una eficacia similar, si bien la iCaspasa actúa con mayor rapidez (Marin, V., *et al.*, 2012, *Human gene therapy methods*, 23(6): p. 376-86). Sin embargo, la eficacia del sistema iCaspasa se ve considerablemente reducida en células que presentan un nivel bajo o intermedio de expresión de este transgén, lo que tiene un impacto negativo en su funcionalidad a nivel clínico (Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, *et al.*, 2011, *N Engl J Med.*, 365(18):1673-1683).

Otros genes suicidas descritos hasta la fecha son la enzima timidilato kinasa humana mutada (mTMPK), donde las células que la expresan son susceptibles a dosis terapéuticas del agente Zidovudina (AZT) (Sato *et al.*, 2007, *Mol. Ther.* 15, 962-970). La expresión del antígeno CD20 se ha propuesto también como estrategia suicida (Serafini *et al.*, 2004, *Hum. Gene Ther.*, 15:6, 3-76). Las células que expresan el gen que lo codifica pueden ser destruidas selectivamente mediante la administración del anticuerpo terapéutico rituximab. La principal desventaja de esta estrategia es la depleción transitoria concomitante del compartimento de células B del paciente. De hecho, no existen actualmente resultados clínicos con este sistema. Otra herramienta suicida propuesta es el gen de la citosina deaminasa de *E. coli* (CD). La CD puede ser activada por el compuesto 5-FC (5 fluorouracilo). Esta estrategia ha mostrado tener efectos citotóxicos en cáncer de mama, glioma, cáncer de colon y otros tumores (Brade *et al.*, 2003, *Cancer Gene Ther*, 10, 294-301).

Sin embargo, debido a las limitaciones de la terapia génica suicida individual, se ha probado también la terapia génica con combinaciones de genes suicidas, no obstante, la falta de un promotor con actividad específica limita la aplicación de esta aproximación en tumores. Un ejemplo de construcción génica de fusión es el sistema suicida doble CD/TK expresado a partir de un vector adenoviral en presencia del promotor survivina. Este sistema doble ha mostrado poseer un efecto mejorado inhibiendo el crecimiento de tumores cuando es activado por GCV y 5-FC en comparación con el efecto de estos dos genes suicidas aplicados individualmente (Xian-Run Luo, *et al.*, 2012, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 13, pp-781-784).

No obstante, dado que en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha con las construcciones génicas suicidas actuales solo se han conseguido eliminar parcialmente las células portadoras de la construcción, se hace necesario disponer de un sistema génico suicida mejorado que permita eliminar de manera selectiva y con mayor eficacia y fiabilidad poblaciones

celulares concretas en el interior de un organismo cuando su presencia suponga un riesgo para la salud, reduciendo al mínimo la presencia de células diana resistentes al tratamiento.

## DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una construcción génica suicida doble e inducible que combina la capacidad inductora de muerte celular de los dos genes suicidas HSV-TK e iCaspasa9. De esta manera, el efecto de ambos genes suicidas se complementa proporcionando un mecanismo de seguridad dotado de redundancia y por lo tanto más eficaz y fiable.

Esta construcción génica doble ha demostrado además presentar, *in vivo*, un efecto en la inducción de muerte celular, cuando ambos genes se activan simultáneamente con sus correspondientes inductores o efectores, claramente superior al de cada uno de estos dos genes suicidas por separado (ver ejemplos mostrados más adelante). En particular, el número de colonias celulares comprendiendo la construcción que fueron resistentes al tratamiento combinado fue menor que cuando se administraron los dos tratamientos por separado (ver Fig. 9), llegándose a detener completamente e incluso a reducir el crecimiento tumoral (ver Fig. 15).

Por tanto, la construcción génica suicida que se describe aquí es la más adecuada para su aplicación en clínica de cuantas se han descrito hasta la fecha. La presente invención supone así una solución al problema planteado, al proporcionar un sistema génico suicida mejorado que elimina selectivamente y con mayor eficacia poblaciones celulares indeseadas.

La utilidad inmediata de este sistema reside en su uso en células trasplantadas que, como consecuencia de haber sido manipuladas *ex-vivo*, puedan representar un riesgo después de haber sido transferidas al organismo receptor. Además, los ejemplos mostrados más adelante demuestran la eficacia de esta construcción génica suicida tanto en líneas celulares tumorales humanas como en células madre humanas trasplantadas. Por lo tanto, la construcción génica descrita en esta invención puede ser aplicada, pero sin limitaciones, tanto en trasplantes celulares o tisulares en medicina regenerativa, incluyendo "Adoptive T-cell therapy" o terapia adoptiva de linfocitos T, como directamente en células tumorales endógenas si la construcción se introduce en ellas mediante vectores específicamente dirigidos. Otra posibilidad sería su utilización para inducir la muerte "por contagio" en células cancerígenas por su proximidad a células portadoras de la construcción suicida que se hayan situado en las inmediaciones del tumor. En general, esta construcción es útil como mecanismo genético de seguridad en cualquier circunstancia en la que resulte necesario eliminar a voluntad una población celular concreta en el interior de un organismo, de forma específica y sin necesidad de intervención física.

La construcción génica policistrónica o casete suicida de la invención comprende una secuencia codificante para la iCaspasa9 y una secuencia codificante para la HSV-TK. Esta construcción génica se ha diseñado, además, para minimizar el riesgo de inactivación por parte de los mecanismos endógenos de defensa celular y maximizar la expresión de las dos proteínas suicidas. En particular, esta construcción presenta varias características que la hacen óptima para garantizar el mejor funcionamiento posible de un casete suicida. En primer lugar, la presencia de dos elementos 2A permite la expresión al mismo nivel de al menos dos proteínas, preferiblemente tres cuando se coexpresa un gen marcador, a partir de un único promotor eucariótico preferiblemente constitutivo. La incorporación de dicho gen marcador al casete permite detectar y cuantificar el nivel de expresión de la construcción. Por otro lado, si se incluye un promotor de origen humano, como puede ser el promotor EF1- $\alpha$ , se reduce la posibilidad de silenciamiento o reducción de su actividad por parte de los mecanismos de defensa de la célula cuando la construcción se aplica a células humanas. Además, la presencia de un intrón de la  $\beta$ -globina maximiza la transcripción de los genes comprendidos en el casete. Por último, la coexistencia en la célula de cada una de las dos proteínas suicidas a niveles semejantes hace posible comparar su actividad de forma directa y sin sesgos debidos a efectos de integración o expresión.

En la Fig. 1 se muestra un esquema de la estructura preferida de la construcción génica de la invención.

Por todo lo expuesto anteriormente, un primer aspecto de la invención se refiere a una construcción génica policistrónica, de ahora en adelante "construcción génica de la invención" o "casete de expresión de la invención", que comprende:

- a. un promotor génico preferiblemente de origen eucariótico,
- b. un intrón, preferiblemente el de la beta-globina o beta-actina, más preferiblemente el de la beta-globina,
- c. una secuencia nucleotídica codificante para la proteína icaspasa9,
- d. un primer elemento iniciador o continuador de la traducción desde el interior del mensajero policistrónico, preferiblemente del tipo 2A,
- e. una secuencia nucleotídica codificante para la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex,
- f. un segundo elemento iniciador o continuador de la traducción desde el interior del mensajero policistrónico, preferiblemente del tipo 2A, y
- g. preferiblemente al menos un gen marcador,

donde más preferiblemente los elementos (a) a (g) se encuentran dispuestos en sentido 5'-3' en dicha construcción génica.

El término "construcción génica" o "casete de expresión" se refiere a la unidad de ADN en la que un material genético de interés se puede introducir para ser expresado como proteína o RNA en una célula. Los elementos comprendidos dentro de la construcción génica se encuentran en marco de lectura u "operativamente unidos", es decir, orientados secuencialmente entre sí de tal manera que ello les permite funcionar en la manera intencionada, permitiendo que la expresión (es decir, la transcripción y traducción) de la/s secuencia/s codificante/s tenga lugar en condiciones compatibles con los demás elementos o secuencias presentes en la construcción.

En la presente invención se entiende por "policistrónico" la disposición en tándem de varios genes. Así, una "construcción génica policistrónica", como la de la presente invención, codifica para múltiples polipéptidos diferentes.

Como se usa aquí, el término "promotor génico" hace referencia a una región o secuencia de ADN, generalmente situada "aguas arriba" o "upstream" del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción de una secuencia nucleotídica en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarnos, promotores constitutivos o inducibles/reprimibles, así como promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores ubicuos. Preferiblemente, el promotor al que se refiere la invención es constitutivo. El origen del promotor seleccionado dependerá de la célula en la que se quiera expresar la construcción génica de la invención. Así, pueden emplearse promotores de origen eucariota, procariota o vírico. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *E. coli*, o el promotor del gen  $\alpha$ -amilasa de *B. subtilis*. Ejemplos de promotores víricos son, pero sin limitarnos, el promotor del citomegalovirus, el promotor SV40, del LTR del virus del sarcoma de Rous, del LTR del virus de la leucemia murina o de la timidina kinasa del virus del herpes simplex. Ejemplos de promotores eucarióticos son, pero sin limitarnos, el promotor de la beta actina humana, TRE, UAS, Ac5, de polihedrina, CaMKIIa, GAL1, 10, TEF1, GDS, ADH1, CaMV35S, H1, U6, B29, de CD14, de CD43, de CD45, de CD68, de desmina, de elastasa-1, de endoglina, de fibronectina, de GFAP, de Flt-1, EF1 alfa, PGK, CAG ó UBC.

En una realización preferida, el promotor comprendido en la construcción génica de la invención es un promotor génico de origen eucariótico, más preferiblemente humano, aún más preferiblemente es un promotor constitutivo de origen humano. Algunos ejemplos de promotores de este tipo que podrían emplearse en la construcción son, pero sin limitarnos, el promotor de PGK1 (phosphoglycerate kinase), el de la ubiquitina C (UBC), el de EF1 alfa y el de la  $\beta$ -actina (ACTB). En una realización particular, el promotor es el de EF1 alfa (de sus siglas en inglés "Human Elongation Factor 1 alpha"), más preferiblemente donde dicho promotor EF1 alfa es el mostrado en la secuencia SEQ ID NO: 6.

Debido a la degeneración del código genético, en el cual diversos tripletes de nucleótidos dan lugar a un mismo aminoácido, existen diversas secuencias de nucleótidos que dan lugar a una misma secuencia aminoacídica. Los términos "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico", "oligonucleótido" y "polinucleótido" se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud que pueden estar o no química o bioquímicamente modificados. Se refieren, por tanto, a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, tanto de cadena sencilla como de doble hebra. Las secuencias nucleotídicas codificantes de la presente invención pueden obtenerse de manera artificial mediante métodos de clonación y selección convencional, o mediante secuenciación. Las secuencias nucleotídicas codificantes de la presente invención pueden comprender otros elementos, como por ejemplo aunque sin limitarse, intrones, secuencias no codificantes en los extremos 5' o 3', sitios de unión a ribosomas, o secuencias estabilizadoras. Estos polinucleótidos adicionalmente pueden incluir secuencias codificantes para aminoácidos adicionales que puedan ser útiles, por ejemplo, aunque sin limitarse, para aumentar la estabilidad del péptido generado a partir de él o permitir una mejor purificación del mismo.

En otra realización preferida de la presente invención, la "secuencia nucleotídica codificante para la proteína icaspasa9" es la SEQ ID NO: 1 o cualquier secuencia derivada de ella por optimización de codones. En otra realización preferida de la presente invención, la "secuencia nucleotídica codificante para la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex" es la SEQ ID NO: 2 o cualquier secuencia derivada de ella por optimización de codones.

El "intrón de la beta-globina" es, preferiblemente, el descrito en la SEQ ID NO: 3.

La proteína "icaspasa9", "caspasa 9 inducible", "iCasp9" o "iC9" es la caspasa 9 inducible exógenamente, es decir, cuya activación o estado dimerizado es independiente de factores intracelulares y solo depende de la acción desde el exterior administrando una molécula dimerizadora o efectora específica. Esta icaspasa9 es el polipéptido descrito en la literatura, por ejemplo pero sin limitarnos, en Di Stasi, *et al.*, 2011, *N. Engl. J. Med.* 365, 1673-1683. Dicha icaspasa9 comprende una sustitución en su dominio de dimerización, *Caspase Recruitment Domain* (CARD, GenBank NM001229), por una variante de la FK506 *Binding Protein* que contiene la mutación F36V (FKBP12, GenBank AH002818). Es decir, la icaspasa9 comprende el dominio FKBP12-F36V unido, vía un enlazador, a la  $\Delta$ caspasa 9, donde la  $\Delta$ caspasa 9 es la

proteína caspasa 9 sin su dominio de dimerización fisiológico CARD. En otra realización preferida, la secuencia aminoacídica de la icaspasa9 es la SEQ ID NO: 4.

La proteína "timidina kinasa del virus del herpes simplex" o "HSV-TK" es la descrita en, por ejemplo pero sin limitarnos, Ciceri, F., *et al.*, 2007, Blood 109, 4698-4707. En otra realización preferida, la secuencia aminoacídica de la HSV-TK es la SEQ ID NO: 5.

El "elemento iniciador o continuador de la traducción" al que se hace referencia aquí puede seleccionarse, por ejemplo, pero sin limitarnos, de entre un elemento del tipo 2A o un elemento IRES. Preferiblemente, el primer elemento iniciador o continuador de la traducción es del tipo 2A y el segundo elemento iniciador o continuador de la traducción es IRES. Más preferiblemente, tanto el primer como el segundo elemento iniciador o continuador de la traducción es del tipo 2A.

El "elemento 2A" al que se refiere la presente invención es una secuencia nucleotídica codificante para un péptido 2A, el cual es un oligopéptido de entre 19 y 22 aminoácidos de longitud que se escinde del polipéptido finalmente expresado con el que se co-expresa. Esta secuencia nucleotídica puede obtenerse a partir de una variedad de virus, por ejemplo, de Thosea asigna (T2A) o del virus de la enfermedad boca-pie (FMDV). Este péptido 2A se suele encontrar entre dos proteínas en los virus de la familia de los picornavirus. Puede obtenerse, por ejemplo, pero sin limitaciones, del teschovirus-1 porcino (P2A), del virus de la rinitis equina A (E2A), del virus de la poliedrosis citoplasmática (BmCPV 2A), del virus flacherie (BmIFV 2A), del virus de la enfermedad boca-pie, del virus Avisivirus A, del virus de la hepatitis A de patos, del virus de la encefalomiocarditis, del virus Cosavirus A, del virus Seneca Valley, del virus Hunnivirus A, del virus Kunsagivirus A, del virus Mischivirus A, del virus Mosavirus A2, o del virus Pasivirus A1. Puede obtenerse también de otras familias de virus como por ejemplo, pero sin limitación, de las familias Iflaviridae, Tetraviridae, Dicistroviridae y Reoviridae. Este elemento 2A permite la expresión de dos o más proteínas funcionales a partir de una única construcción génica. En la construcción génica de la invención, el primer y segundo elemento 2A pueden ser iguales o diferentes entre sí, preferiblemente son diferentes. En otra realización preferida, el primer elemento 2A comprendido en la construcción génica de la invención es T2A y el segundo elemento 2A es P2A. Más preferiblemente, el elemento T2A es el péptido de secuencia SEQ ID NO: 7 y está codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 8. Aún más preferiblemente, el elemento P2A es el péptido de SEQ ID NO: 9 y está codificado por la secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 10.

El "gen marcador" al que se refiere la presente invención puede ser cualquier gen cuyo producto de expresión pueda ser identificado, detectado y/o cuantificado por proporcionar un cambio identificable en la célula que lo expresa. Así, la presencia y expresión del gen marcador en la construcción génica de la invención permitirá identificar fácilmente aquellas células que comprenden dicha construcción. Dicho gen marcador puede ser, por ejemplo pero sin limitarnos, un gen que confiere resistencia metales o a drogas, preferiblemente a antibióticos, tales como por ejemplo genes que confieren resistencia a neomicina, puomicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina, histidinol, estreptomycin, ampicilina, o similares. Genes reporteros inducibles o no, tales como GFP, EGFP, mCherry, luciferasa, IRV3, o cualquier otra proteína fluorescente o quimio o bioluminiscente, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), peroxidasa de rábano (HRP) o similares. También pueden emplearse genes marcadores codificantes para epítomos o moléculas inmunogénicas, como por ejemplo, pero sin limitarnos FLAG, HA, His, Myc, V5, Xpress, Thrombin, DAD, S Tag, Proteína C, o para receptores expresados en la superficie celular, tales como CD34, CD19,  $\Delta$ NGFR o  $\Delta$ NGFR truncados. La selección del gen marcador no es relevante siempre que éste pueda ser expresado simultáneamente con las secuencias nucleotídicas codificantes indicadas en los elementos (c) y (e) de la construcción génica de la invención. Preferiblemente, el gen marcador al que se refiere la presente invención es el gen codificante para el receptor de membrana truncado  $\Delta$ NGFR, cuyo uso en clínica está aceptado y aprobado. Más preferiblemente, el gen codificante para el receptor de membrana truncado  $\Delta$ NGFR es el de SEQ ID NO: 11 y el receptor de membrana truncado  $\Delta$ NGFR codificado por él es el de SEQ ID NO: 12.

La construcción génica de la invención puede introducirse en un vector de clonación o expresión para permitir su replicación y expresión en el interior de una célula. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión de los polipéptidos codificados por la construcción génica de la invención. Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector de expresión, de ahora en adelante "vector de expresión de la invención", que comprende la construcción génica de la invención.

El término "vector de expresión" o "vector de clonación", tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a una construcción de ácido nucleico, preferiblemente de ADN, en la que se puede integrar la construcción génica de la invención sin que dicho vector pierda su capacidad de replicación. El vector de expresión está diseñado para dirigir la transformación o transducción de dicha construcción génica, o de una secuencia nucleotídica codificante para uno o varios genes de interés, en el interior de una célula diana y su posterior replicación y expresión. El vector comprende, además de la construcción génica de la invención, otros elementos genéticos secuencialmente orientados (operativamente unidos) de manera que la construcción génica de la invención puede ser transcrita y traducida en la célula. Dichos elementos genéticos pueden ser, pero sin limitaciones, un promotor, un terminador, una secuencia líder, un sitio de iniciación de la

- transcripción, uno o varios orígenes de replicación, una región reguladora 3' y/o 5' no traducida, un potenciador, una señal de poliadenilación, o cualquier otra secuencia control. El vector de expresión puede comprender además secuencias que dirijan la expresión de la construcción génica de la invención comprendida en él en un tipo celular concreto, en una sublocalización celular concreta o en un tejido concreto. Preferiblemente, dicho vector comprende secuencias que dirigen la expresión de la construcción génica de la invención específicamente en células tumorales.
- El vector de expresión de la invención puede seleccionarse, pero sin limitaciones, de entre un plásmido, fago, cósmido, fagémido, secuencia replicante autónoma (ARS), cromosoma artificial de levadura (YAC), cromosoma artificial de bacteria (BAC), cromosoma artificial humano (HAC), o vectores virales tales como, pero sin limitarnos, lentivirus, baculovirus, adenovirus, retrovirus, vector viral adenoasociado (AAV), o cualquier otro tipo de molécula de ADN con capacidad de replicarse en el interior de una célula procariota o eucariota, preferiblemente eucariota. Preferiblemente, dichos vectores son los plásmidos pLF1a-Suicida(Hygro)2.0 y pSuicida-OL- $\square$ NGFR. En otra realización preferida, el vector de expresión es un vector viral.
- El vector de expresión de la invención puede ser un vector autorreplicante, cuya replicación es independiente del genoma de la célula en la que se introduce, o puede ser un vector que una vez transfectado a la célula diana se integra en el genoma de la misma y se replica con el mismo. Así, el vector puede comprender secuencias que faciliten su inserción en una localización determinada dentro del genoma de la célula hospedadora.
- Otro aspecto de la invención se refiere a una célula o población celular aislada (*ex vivo*) que comprende (y preferiblemente expresa) la construcción génica de la invención o el vector de expresión de la invención. De ahora en adelante también se hará referencia a esta célula o población celular como "célula o población celular de la invención". Este aspecto de la invención también se extiende a la progenie de esta célula o población celular de la invención.
- La célula o población celular de la invención ha sido transducida, transfectada, transformada o similares con la construcción génica o el vector de expresión de la invención mediante cualquier técnica de ingeniería genética de entre las conocidas en la técnica para tal fin. Dichas técnicas pueden ser, por ejemplo pero sin limitarnos, inyección o microinyección, transformación *ex vivo*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol, sonicación, biofísica, infección retroviral, transfección mediada por liposomas (lipofección) o por receptor, u otras técnicas ampliamente conocidas en el arte.
- Los términos "transfección", "transducción" y "transformación" se usan aquí de manera intercambiable para definir los métodos mediante los cuales el material genético de una célula ha sido alterado, preferiblemente aumentado, por la introducción mediante técnicas de ingeniería genética de la construcción génica o del vector de expresión de la invención.
- La célula o población celular de la invención puede ser de origen alogénico, xenogénico o autólogo, aunque preferiblemente es de origen autólogo.
- El término "alogénico" se refiere a una célula que procede de otro sujeto o individuo de la misma especie que el sujeto o individuo al que le va a ser administrada dicha célula tras su manipulación *ex vivo*.
- El término "xenogénico" se refiere a una célula que procede de un sujeto o individuo de otra especie distinta a la del sujeto o individuo al que le va a ser administrada dicha célula tras su manipulación *ex vivo*.
- El término "autólogo" se refiere a una célula que procede del mismo sujeto o individuo que el sujeto o individuo al que le va a ser administrada dicha célula tras su manipulación *ex vivo*.
- En otra realización preferida, la célula o población celular de la invención es eucariota. Dicha célula puede ser de origen humano o de un animal-no humano, como por ejemplo mamífero no humano tales como, pero sin limitarnos, ratón, rata, mono, cerdo, conejo, perro o gato. Más preferiblemente, la célula o población celular de la invención es humana.
- En una realización particular, la célula o población celular de la invención es humana y autóloga.
- En otra realización preferida, la célula o población celular de la invención es una célula o población celular del sistema inmune, más preferiblemente es un linfocito T o población de linfocitos T, donde el término "linfocito T" incluye también los linfocitos T modificados para expresar en superficie un receptor de antígeno quimérico (también llamados *CART cells*).
- Ejemplos de "células del sistema inmune" son, pero sin limitarnos, células polimorfonucleares, monocitos, neutrófilos, macrófagos, basófilos, mastocitos, eosinófilos, células dendríticas, microglía, células de Kupffer, células dendríticas foliculares, células NK o linfocitos.

Una "célula T" o "linfocito T" es la célula del sistema inmune perteneciente al grupo de glóbulos blancos generalmente implicada en la inmunidad celular y cuya maduración tiene lugar en el timo. Presenta proteínas de superficie celular conocidas como "receptores de células T". Estas células se activan por la presencia de un determinante antigénico, citoquinas y/o linfoquinas. Dentro del término "linfocito T" se incluyen los linfocitos T auxiliares (*helper*) o CD4+, los linfocitos T citotóxicos o CD8+, los linfocitos T de memoria, los linfocitos T reguladores y los linfocitos T gamma-delta.

En otra realización preferida, la célula o población celular de la invención es tumoral o una célula madre o población de células madre o células diferenciadas derivadas de células madre.

La "célula tumoral" a la que se refiere la presente invención es cualquier célula procedente de un tumor benigno o maligno, preferiblemente maligno, más preferiblemente de cáncer. Dicha célula es, más preferiblemente, de carcinoma de próstata, de coriocarcinoma o de carcinoma de colon.

La "célula madre" a la que se refiere la presente invención puede ser, pero sin limitarnos, totipotente, pluripotente, pluripotente inducida (iPSC), multipotente, unipotente o progenitora, germinal o célula madre residente en un tejido adulto, por ejemplo célula madre hematopoyética (HSC), célula madre de la grasa o célula madre mesenquimal. Asimismo, dicha célula puede ser adulta, embrionaria no humana, o embrionaria humana obtenida mediante un método que no comprometa la viabilidad del embrión. La célula madre a la que se refiere la presente invención puede proceder, por ejemplo pero sin limitarnos, de cordón umbilical, líquido amniótico, médula ósea, sangre periférica, tejido adiposo, músculo, córnea o pulpa dental o de cualquier nicho de células madre presente en los tejidos de un individuo. En una realización más preferida, la célula madre de la invención es una célula progenitora neural, una célula progenitora hematopoyética, una célula madre de la grasa, una célula mesenquimal o una iPSC, aún más preferiblemente una iPSC.

Una "célula madre pluripotente inducida" o "iPSC" es una célula adulta o diferenciada que ha sido reprogramada o inducida a desdiferenciarse mediante técnicas genéticas (por la expresión de determinados genes), biológicas (por el tratamiento con, por ejemplo, virus o retrovirus) y/o químicas (con pequeñas moléculas, péptidos y similares), de manera que se consigue activar su capacidad pluripotente. Las iPSCs son por tanto capaces de diferenciarse en la mayoría o en todos los tipos celulares, al igual que las células madre embrionarias.

Una "célula progenitora hematopoyética" es una célula capaz de diferenciarse a los tipos celulares de la sangre maduros. Estas células pueden aislarse, por ejemplo, desde médula ósea, cordón umbilical o sangre periférica.

Una "célula diferenciada derivada de células madre" es una célula madre que ha sido artificialmente (es decir, por intervención humana) inducida a diferenciarse, *in vivo* o *in vitro*, en un tipo celular de interés mediante técnicas genéticas, biológicas y/o químicas, por ejemplo que ha sido sometida a unas condiciones de cultivo tales que le han permitido adquirir el estado diferenciado de interés.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición o preparación combinada, de ahora en adelante "composición de la invención", que comprende:

- i. la construcción génica de la invención, el vector de expresión de la invención o la célula o población celular de la invención,
- ii. un sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex, y
- iii. un activador de la proteína icaspasa9.

Alternativamente, esta composición de la invención puede comprender los elementos (ii) y (iii) mostrados arriba y no comprender el elemento (i), en cuyo caso dicha composición se administraría a un organismo o sujeto en el que ha sido previamente introducida la construcción génica, el vector o la célula o población celular de la invención.

El término "preparación combinada", también denominada "yuxtaposición", significa que los componentes de la composición no necesitan encontrarse presentes como unión para poder estar disponibles para su aplicación separada o secuencial. De esta manera, la expresión "yuxtapuesta" implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

Preferiblemente, el "sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex" al que se hace referencia a lo largo de la descripción y reivindicaciones se selecciona de la lista que consiste en: Ganciclovir, Aciclovir, AZT, Stavudine, Idoxuridine o FIAU (1-(2-desoxi-2-fluoro-1-D-arabinofuranosido)-5-iodouracil). Más preferiblemente, dicho sustrato es Ganciclovir (Número CAS: 82410-32-0).

Preferiblemente, el "activador de la proteína icaspasa9" al que se hace referencia a lo largo de la descripción y reivindicaciones es AP20187 o un análogo del mismo como por ejemplo AP1510, o AP1903 (Número CAS: 195514-63-7). Más preferiblemente, dicho activador es AP20187 (Número CAS: 195514-80-8).



En otra realización preferida, la composición de la invención es una composición farmacéutica, donde más preferiblemente dicha composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente y/u otro principio activo, aún más preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención, preferiblemente de los elementos (ii) y (iii), estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como
- 10 por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, como por ejemplo, es el caso del fosfato de calcio dibásico; la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes, preferiblemente de los elementos (ii) y (iii), y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.
- 15 El “vehículo”, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes de la presente invención comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacológicamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. El vehículo puede ser un diluyente, coadyuvante o portador con el que se debe administrar la composición farmacéutica de la invención. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacológicamente aceptable es el diluyente. El vehículo puede ser líquido, tal como agua, disolvente, aceite o surfactante, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético.
- 20 La composición de la invención, preferiblemente en lo que se refiere a los elementos (ii) y (iii) (activadores y sustratos), se puede administrar junto con un vehículo de liberación sostenida. El término “vehículo de liberación sostenida” se refiere a un sistema de vehiculización que proporciona la liberación gradual de los compuestos comprendidos en la composición durante un periodo de tiempo y preferiblemente, aunque no necesariamente, con niveles de liberación relativamente constantes a lo largo de dicho periodo de tiempo. Ejemplos de vehículos o sistemas de liberación sostenida incluyen, aunque no se limitan a, liposomas, liposomas mixtos, oleosomas, niosomas, etosomas, milicápsulas, microcápsulas, nanocápsulas, esponjas, ciclodextrinas, vesículas, micelas, micelas mixtas de tensioactivos, micelas mixtas fosfolípidotensioactivo, miliesferas, microesferas, nanoesferas, lipoesferas, microemulsiones, nanoemulsiones, minipartículas, milipartículas, micropartículas, nanopartículas, nanopartículas sólidas lipídicas o soportes lipídicos nanoestructurados.
- 25 El término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.
- 30 La composición de la invención, preferiblemente en lo que se refiere a los elementos (ii) y (iii), se puede presentar en forma de una formulación sólida, líquida, semi-sólida (por ejemplo, gel) o granulada. Ejemplos de este tipo de formulaciones son, pero sin limitarnos, cremas, emulsiones múltiples, composiciones anhidras, dispersiones acuosas, aceites, leches, bálsamos, espumas, lociones, geles, geles crema, soluciones hidroalcohólicas, soluciones hidroglicólicas, hidrogeles, linimentos, sueros, ungüentos, mousses, pomadas, polvos, barras, lápices, vaporizadores, aerosoles, cápsulas, cápsulas de gelatina, cápsulas blandas, cápsulas duras, píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, formas granuladas, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, jaleas, gelatina, liposomas o nanoesferas o en cualquier otro formato convencional de liberación sostenida.
- 35 La composición de la presente invención, preferiblemente en lo que se refiere a los elementos (ii) y (iii), puede administrarse a un animal, incluyendo a un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.
- 40 La composición de la invención comprende los elementos (i) a (iii) en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por “cantidad terapéuticamente efectiva” la cantidad de construcción génica, vector de expresión o célula o población celular de la invención, de sustrato de la proteína HSV-TK y de activador de la proteína icaspasa9, que produzca el efecto deseado, es decir, muerte celular dirigida y específica. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva dependerá de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, condición

patológica o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención. Los expertos en la materia sabrán ajustar dicha dosis en función de estos y otros parámetros.

- 5 Además, la composición de la invención puede utilizarse tanto sola como en combinación con otras composiciones o medicamentos usados para el tratamiento y/o prevención de patologías, enfermedades, síndromes, trastornos, condiciones patológicas o fisiológicas que cursan con la presencia y/o proliferación indeseada de células, preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de tumores, de la enfermedad injerto contra huésped o de rechazo a trasplantes. Así, la composición de la invención puede ser empleada junto a otros principios activos, comprendidos en ella o no, o terapias a modo de terapia combinada.
- 10 Preferiblemente, la composición de la invención está formulada para la administración simultánea o secuencial de los elementos (ii) y (iii) comprendidos en ella, más preferiblemente para su administración simultánea.
- 15 Otro aspecto de la invención se refiere a la construcción génica de la invención, al vector de expresión de la invención, a la célula o población celular de la invención o a la composición de la invención, para su uso como medicamento. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al uso de la construcción génica de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula o población celular de la invención o la composición de la invención, para la elaboración de un medicamento.
- 20 En una realización preferida, y particularmente cuando el medicamento al que se refiere la presente invención comprende la célula o población celular de la invención, dicho medicamento es un medicamento de terapia celular, preferiblemente para su uso en trasplantes.
- 25 En otra realización preferida, y particularmente cuando el medicamento al que se refiere la presente invención comprende la construcción génica o el vector de expresión de la invención, el medicamento de la invención es un medicamento de terapia génica.
- 30 El término "terapia celular" o "citoterapia" se refiere a la terapia en la cual se administra al paciente material celular o células, en el contexto de la presente invención la célula o población celular de la invención vivas.
- El término "terapia génica" se refiere a la terapia en la cual se introduce material genético, en el contexto de la presente invención la construcción génica o el vector de expresión de la invención, en las células del sujeto a ser tratado.
- 35 Los términos "paciente", "organismo", "individuo" o "sujeto" se emplean aquí de manera intercambiable e incluyen, pero sin limitación, un animal, preferiblemente mamífero, como por ejemplo humano, primate no humano (por ejemplo, mono), roedor (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo), cerdo, vaca, oveja, cabra, caballo, etc. El sujeto al que se refiere la presente invención también puede ser un ave o un pez. En una realización más preferida, dicho sujeto es humano.
- 40 El término "medicamento" hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, alivio, tratamiento o curación de patologías, enfermedades, síndromes, trastornos, condiciones patológicas o fisiológicas que cursan con la presencia y/o proliferación indeseada de células; preferiblemente de tumores, de la enfermedad injerto contra huésped o de rechazo a trasplantes.
- 45 El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.
- 50 Otro aspecto de la invención se refiere a la construcción génica de la invención, al vector de expresión de la invención, a la célula o población celular de la invención o a la composición de la invención para su uso en la inducción de muerte celular dirigida y selectiva o específica o para su uso en la eliminación de células diana no deseadas. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al uso de la construcción génica de la invención, del vector de expresión de la invención, de la célula o población celular de la invención o de la composición de la invención para la inducción de muerte celular dirigida y selectiva o específica o para la eliminación de células diana no deseadas.
- 55 Otro aspecto de la invención se refiere a la construcción génica de la invención, al vector de expresión de la invención, a la célula o población celular de la invención o a la composición de la invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención de patologías, enfermedades, síndromes, trastornos, condiciones patológicas o fisiológicas que cursan con la presencia
- 60

y/o proliferación indeseada de determinadas células. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al uso de la construcción génica de la invención, el vector de expresión de la invención, la célula o población celular de la invención o la composición de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de patologías, enfermedades, síndromes, trastornos, condiciones patológicas o fisiológicas que cursan con la presencia y/o proliferación indeseada de determinadas células.

Otro aspecto de la invención se refiere a la construcción génica de la invención, al vector de expresión de la invención, a la célula o población celular de la invención o a la composición de la invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención de tumores, preferiblemente cáncer, de la enfermedad injerto contra huésped o de rechazo a trasplante. Alternativamente, este aspecto de la invención se refiere al uso de la construcción génica de la invención, del vector de expresión de la invención, de la célula o población celular de la invención o de la composición de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de tumores, preferiblemente cáncer, de la enfermedad injerto contra huésped o de rechazo a trasplante.

En otra realización preferida de la presente invención, el sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex y el activador de la proteína icaspasa9 comprendidos en la composición de la invención se administran de manera simultánea.

El término "tratamiento" se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión parcial o total de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término "prevención" consiste en evitar la aparición de la enfermedad o condición patológica, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

El término "tumor", tal y como se emplea aquí, se refiere a cualquier tipo de neoplasia, es decir, no se limita simplemente a neoplasias malignas sino que comprende también neoplasias benignas, displasias, hiperplasias o leucoplasias. Así, el término "tumor" incluye cualquier enfermedad neoplásica en la cual células, de morfología anormal, presentan un crecimiento, división o proliferación descontrolados llegando a generar una masa celular denominada tumor, bien sea maligno o benigno.

El término "cáncer" se refiere a la neoplasia maligna en la cual el organismo comprende un exceso de células malignas (células cancerígenas o cancerosas), con crecimiento descontrolado y división más allá de los límites normales, que en estadios avanzados conduce a la invasión del tejido circundante y, finalmente, a metástasis. Comprende cualquier enfermedad de un órgano o tejido, preferiblemente en un mamífero, más preferiblemente en el hombre, caracterizada por una multiplicación pobremente controlada o descontrolada de células normales o anormales en dicho tejido, y su efecto en la totalidad del cuerpo. Las células y los tejidos son cancerosos cuando crecen y se replican más rápidamente de lo normal, desplazándose o dispersándose en el tejido sano circundante o en cualquier otro tejido del cuerpo, lo que se conoce como metástasis, asume formas y tamaños anormales, muestra cambios en su ratio nucleocitoplasmático, policromasia nuclear, y finalmente cesa. Células y tejidos cancerosos pueden afectar al cuerpo como un todo, causando síndromes paraneoplásicos, o pueden ocurrir en un órgano o tejido vital siendo interrumpida o dañada su función normal, con posibles resultados fatales. Generalmente se dice que el cáncer se encuentra en uno de tres estadios de crecimiento: temprano o localizado, cuando el tumor aún se encuentra confinado en el tejido de origen, o en su localización primaria; extensión directa, cuando las células cancerígenas del tumor han invadido el tejido adyacente o se han extendido únicamente a los nódulos linfáticos regionales; o metástasis, cuando las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde la localización primaria, por medio del sistema circulatorio o linfático, y se ha establecido en localizaciones secundarias. El cáncer en cualquiera de estos estadios está comprendido dentro del ámbito de la presente invención.

Ejemplos de "tumores" son, aunque sin limitarnos, carcinoma, sarcoma, carcinosarcoma, adenocarcinoma, blastoma, tumores hematopoyéticos, tumores del linaje linfóide tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfomas tales como linfoma de células B o T o linfoma no-Hodgkin; tumores del linaje mieloide tales como mieloma; tumores de tejidos nerviosos incluyendo el cerebro, astrocitoma, neuroblastoma, glioblastoma o glioma; tumores de la piel como por ejemplo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, queratoxantoma, sarcoma de Kaposi; cáncer de células epiteliales o carcinoma de células escamosas; fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, tumores o cáncer de mama, de próstata, de vejiga, de colon y recto, de pulmón, de riñón (células renales), de estómago, de tiroides, de esófago, de hígado, de páncreas, óseo (osteosarcoma), de timo, de endometrio o uterino, de cuello del útero o carcinoma cervical o cáncer de

cérvix, de ovarios, de vagina, de vulva, de cabeza y cuello, de glándulas salivares, del tracto urinario o cualquier otro tumor sólido.

5 Preferiblemente, el tumor al que se refiere la presente invención es carcinoma de próstata, coriocarcinoma o carcinoma de colon.

10 En general, el medicamento al que se refiere la presente invención es útil ante cualquier situación en la que sea necesario eliminar, de forma controlada y específica, una determinada población celular en el interior de un organismo por provocar efectos adversos. Es decir, dicho medicamento es útil para provocar o inducir muerte celular únicamente de aquellas células específicas comprendiendo la construcción génica o el vector de expresión de la invención que, en el interior de un organismo, preferiblemente en el interior de un tejido, presentan un crecimiento descontrolado o anormal y/o cuya presencia desencadena efectos adversos para la salud del individuo (como por ejemplo, una reacción inmunológica indeseada o la formación de un tumor).

15 La "enfermedad injerto contra huésped" o "GvHD" de sus siglas en inglés "graft versus host disease" se refiere a la complicación clínica asociada al trasplante de médula ósea preferiblemente alogénico y a veces asociada también a las transfusiones de sangre no irradiada en pacientes inmunocomprometidos. Esta enfermedad puede ocurrir cuando las células funcionales del sistema inmune de la médula trasplantada reconocen al receptor como extraño y desencadenen una respuesta inmunológica. Esta enfermedad puede ser aguda o crónica. La forma aguda se puede observar normalmente en los primeros 100 días tras el trasplante o infusión y puede afectar al hígado, piel, mucosas, sistema hematopoyético, médula ósea, timo o similares, pulmones y tracto gastrointestinal. La forma crónica normalmente empieza a los 100 días, o posteriormente, post-trasplante o transfusión y puede atacar a los mismos órganos que la forma aguda pero además puede afectar al tejido conectivo y las glándulas exocrinas.

25 El término "rechazo a trasplante" se refiere al proceso en el cual el sistema inmunitario del receptor de un trasplante ataca al órgano, células o tejido trasplantado. Incluye tanto el rechazo agudo (el cual puede ocurrir en cualquier momento desde la primera semana después del trasplante hasta 3 meses después), como hiperagudo (el cual ocurre unos pocos minutos después del trasplante) y crónico (el cual puede suceder durante muchos años y la respuesta inmunitaria constante del organismo receptor contra el trasplante lentamente daña los tejidos u órganos trasplantados).

30 Por otro lado, la célula o población celular de la invención puede administrarse directamente como medicamento de terapia celular como parte o la totalidad de un trasplante o posteriormente al mismo; o como medicamento de terapia celular para provocar la muerte por contagio en células no deseadas, como por ejemplo en células tumorales, que se encuentren en las inmediaciones de dicha célula o población celular de la invención una vez transferida al organismo.

35 Así, por ejemplo, previamente a un trasplante, las células a trasplantar se pueden transducir o transfectar con la construcción génica o con el vector de expresión de la invención para que, una vez administradas o trasplantadas al organismo receptor y en caso de que lleguen a suponer un problema por ejemplo de rechazo inmunológico, sean susceptibles de ser eliminadas mediante la administración, preferiblemente simultánea, del sustrato de HSV-TK y del activador de la proteína icaspasa9. Alternativamente, la célula o población celular de la invención se puede administrar en las inmediaciones de un trasplante que esté causando rechazo inmunológico o de un tumor para que éstas provoquen la muerte por contagio en las células trasplantadas o células tumorales una vez que se administren los correspondientes activadores y sustratos.

45 Por otro lado, el medicamento al que se refiere la invención se puede aplicar a la terapia con células T. En este caso las células T, previamente a ser administradas al organismo, se transducen o transfieren con la construcción génica o con el vector de expresión de la invención para que, una vez administradas al organismo receptor y en caso de que lleguen a suponer un problema por ejemplo de rechazo inmunológico, sean susceptibles de ser eliminadas mediante la administración, preferiblemente simultánea, del sustrato de HSV-TK y del activador de la proteína icaspasa9.

50 La "terapia con células T" o "terapia adoptiva con células T" se refiere a la expansión y selección *ex vivo* de linfocitos T que van a ser posteriormente administrados a un sujeto con fines terapéuticos. Esta terapia se ha venido usando ampliamente en el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas (HSCT), donde la infusión de linfocitos del donante resulta en un rechazo inmunológico. También se ha empleado, pero sin limitarnos, para el tratamiento de infecciones víricas tales como la del citomegalovirus, linfomas derivados de infección por Epstein Barr y otros tipos de cáncer, incluyendo carcinomas. El término "terapia con células T", tal y como se emplea en la presente invención, incluye también la terapia con linfocitos T que han sido genéticamente manipulados para ser expresar receptores de antígeno quiméricos (lo que se conoce como *CART cell therapy*).

60 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la construcción génica de la invención o del vector de expresión de la invención para generar u obtener, *in vitro*, células útiles para un trasplante. En este sentido, otro aspecto de la invención

se refiere a un método *in vitro* para obtener, generar o preparar células (terapéuticas) útiles para un trasplante, de ahora en adelante "método de la invención", que comprende:

- 5           a. transfectar o transducir las células a ser trasplantadas con la construcción génica de la invención o con el vector de expresión de la invención, y
- b. opcionalmente cultivar dichas células transfectadas o transducidas hasta obtener un número suficiente para un trasplante.

10       En una realización preferida de este aspecto de la invención, las células son eucariotas, más preferiblemente humanas, aún más preferiblemente autólogas. En otra realización preferida, las células referidas en este método de la invención son linfocitos T o células madre o células diferenciadas derivadas de células madre.

15       Estas células a las que se refiere el método de la invención pueden ser posteriormente trasplantadas no solo en situaciones donde se requiera terapia celular para regeneración tisular o para reforzar el sistema inmunológico, sino también para el tratamiento de cáncer si se administran directamente en el tumor o en las inmediaciones del mismo.

Los términos "ex vivo" o "in vitro" se refieren a fuera del cuerpo humano o animal.

20       Otro aspecto de la invención se refiere a un método de trasplante celular a un individuo donde dicho método comprende:

- a. transfectar o transducir las células a ser trasplantadas con la construcción génica de la invención o con el vector de expresión de la invención,
- b. opcionalmente cultivar dichas células transfectadas o transducidas hasta obtener un número suficiente para un trasplante,
- 25       c. trasplantar o administrar las células obtenidas tras el paso (a) o (b) al organismo receptor, y
- d. opcionalmente administrar un sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex y un activador de la proteína icaspasa9 simultáneamente al organismo receptor cuando se desee la eliminación o muerte de las células trasplantadas en el paso (c).

30       En una realización preferida de este aspecto de la invención, las células son eucariotas, más preferiblemente humanas, aún más preferiblemente autólogas. En otra realización preferida, las células referidas en este método de la invención son linfocitos T o células madre o células diferenciadas derivadas de células madre.

35       La expresión "trasplantar" o "administrar" células a un organismo receptor se refiere a la introducción de dichas células en el sujeto a ser tratado mediante cualquier técnica conocida que sirva para tal fin, bien sea por inyección, infusión o similares.

40       Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la construcción génica de la invención, del vector de expresión de la invención o de la composición de la invención para inducir muerte celular en células en cultivo, preferiblemente células eucariotas, más preferiblemente humanas.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para inducir muerte celular en células en cultivo, preferiblemente eucariotas, más preferiblemente humanas, que comprende:

- 45           a. transfectar o transducir las células con la construcción génica de la invención o con el vector de expresión de la invención,
- b. cultivar dichas células transfectadas o transducidas, y
- c. administrar un sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex y un activador de la proteína icaspasa9 simultáneamente al cultivo cuando las células cultivadas en el paso (b) deseen ser eliminadas.

50       Otro aspecto de la invención se refiere a un método para inducir muerte celular en una población celular concreta dentro de un individuo; o método para tratar patologías, enfermedades, síndromes, trastornos, condiciones patológicas o fisiológicas que cursan con la presencia y/o proliferación indeseada de determinadas células; o método para tratar la enfermedad injerto contra huésped, rechazo a un trasplante o un tumor, preferiblemente sólido, más preferiblemente cáncer, en un individuo, donde preferiblemente dicho individuo es un humano, que comprende:

- a. introducir la construcción génica o el vector de expresión de la invención en las células diana que se desee que sean susceptibles de ser eliminadas, preferiblemente mediante uno o varios vectores específicamente dirigidos, donde más preferiblemente dichas células diana son células previamente administradas durante un trasplante o bien células tumorales, y
- 60       b. administrar al individuo un sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex y un activador de la proteína icaspasa9 simultáneamente.

Alternativamente al paso (a) del método descrito en el párrafo anterior se pueden introducir células previamente transfectadas o transducidas con la construcción génica o vector de expresión de la invención, es decir la célula o población celular de la invención, en las inmediaciones del tumor o del trasplante.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1. Representa la estructura de dos casetes suicidas policistrónicos preferidos de la invención.** Se muestran dos posibles versiones de la construcción suicida, la primera con la proteína mCherry (pLF1a-Suicida(Hygro)2.0) y la segunda con el receptor  $\Delta$ NGFR (pSuicida-OL- $\Delta$ NGFR) como genes marcadores.

**Fig. 2. Muestra la caracterización por FACS de las líneas celulares portadoras de las construcciones suicida en los tres tipos de células tumorales testadas.** En ordenadas se representa el número de células, en abscisas la intensidad de la señal fluorescente de *m-Cherry* o FITC en el caso del  $\Delta$ NGFR. Como control se usaron los tipos celulares correspondientes sin transfectar. Las líneas monoclonales se distribuyen según su intensidad de fluorescencia roja o verde. Para cada línea celular se representa el control negativo (C-) un clon con baja expresión de la construcción (1) y un clon con alta expresión de la construcción (2).

**Fig. 3. Muestra la caracterización de la expresión de las proteínas suicidas transgénicas en las poblaciones monoclonales de cada tipo celular.** Se analizó la expresión de las dos proteínas suicidas: iCaspasa 9 (de 46kDa la forma inactiva y 39kDa la forma activa) y la HSV-TK de 40kDa en ausencia de dimerizador y de Ganciclovir. Como control de carga se utilizó Tubulina (50kDa). En cada línea celular se incluyó un control negativo sin transfectar (WT), un clon con baja expresión de la construcción suicida (1) y un clon con alta expresión (2).

**Fig. 4. Muestra la citotoxicidad mediada por AP20187 (100nM) y GCV (10 $\mu$ M) en células HCT116 transfectadas con el casete suicida mCherry.** Microscopía de fluorescencia en GFP, con un objetivo de 5x, en células HCT 116 marcadas con *Calcein Green* y cultivadas con el tratamiento correspondiente durante los tiempos indicados. La barra de escala corresponde a 400 $\mu$ m.

**Fig. 5. Muestra la citotoxicidad mediada por AP20187 (100nM) y GCV (10 $\mu$ M) en células JAR transfectadas con el casete suicida mCherry.** Microscopía de fluorescencia en GFP, con un objetivo 5x, en células JAR marcadas con *Calcein Green* y cultivadas con el tratamiento correspondiente durante los tiempos indicados. La barra de escala corresponde a 400 $\mu$ m.

**Fig. 6. Muestra la citotoxicidad mediada por AP20187 (100nM) y GCV (10 $\mu$ M) en células PC3 transfectadas con el casete suicida mCherry.** Microscopía de fluorescencia en GFP, con un objetivo 5x, en células PC3 marcadas con *Calcein Green* y cultivadas con el tratamiento correspondiente durante los tiempos indicados. La barra de escala corresponde a 400 $\mu$ m.

**Fig. 7. Muestra la citotoxicidad mediada por AP20187 (100nM) y GCV (10 $\mu$ M) en células HCT transfectadas con el casete suicida  $\Delta$ NGFR.** Microscopía de fluorescencia en GFP, con un objetivo 5x, en células HCT 116 marcadas con *Calcein Green* y cultivadas con el tratamiento correspondiente durante los tiempos indicados. La barra de escala corresponde a 400 $\mu$ m.

**Fig. 8. Muestra la cuantificación de la citotoxicidad mediada por AP20187 y GCV en los diferentes clones de las tres líneas celulares: HCT, JAR y PC3.** Se representan los datos obtenidos tras la cuantificación de las imágenes de microscopía con el programa QWIN. En ordenadas se representa el porcentaje de células vivas. En abscisas la duración del tratamiento. A-B) HCT 116 pSuicida-mCherry; C-D) JAR pSuicida-mCherry; E-F) PC3 pSuicida-mCherry y G-H) HCT 116 pSuicida- $\Delta$ NGFR. En todos los casos se muestra con una línea continua el clon con alta expresión de la construcción y con una línea discontinua el clon con baja expresión. Cada punto representa la media de 4 repeticiones.

**Fig. 9. Muestra el número de colonias resistentes a los diferentes tratamientos.** Clones de las líneas HCT 116, JAR y PC3 con alta o baja expresión del vector pSuicida-mCherry se trataron durante 10 días con AP20187 100nM, GCV 10 $\mu$ M o con ambos a la vez.

**Fig. 10. Muestra la caracterización por FACS de los clones de células iPS de ratón portadoras de la construcción suicida.** En ordenadas se representa el número de células, en abscisas la intensidad de la señal fluorescente de mCherry. Como control se usó la misma línea celular sin transfectar. Se representan el control negativo *Wild Type* (C-), un clon con baja expresión (1), y un clon con alta expresión (2).

**Fig. 11. Muestra la caracterización de la expresión constitutiva de las proteínas suicidas transgénicas en las poblaciones monoclonales de células iPS mediante Western Blot.** Se analizó la expresión de las dos proteínas suicidas: iCaspasa 9 (de 46kDa la forma inactiva y 39kDa la forma activa) y la HSV-TK de 40kDa. Como control de carga se utilizó Tubulina (50kDa). Se incluyeron un control negativo WT, un clon con baja expresión de la construcción suicida (1) y un clon con una alta expresión (2).

**Fig. 12. Muestra la citotoxicidad mediada por AP20187 (100nM) y GCV (10µM) en células iPS de ratón transfectadas con el casete suicida mCherry.** Microscopía de fluorescencia en GFP, con un objetivo 5x, de células M625.2 D4 marcadas con *Calcein Green* y cultivadas con el tratamiento correspondiente. La barra de escala se corresponde con 400µm.

**Fig. 13. Muestra la cuantificación de la citotoxicidad mediada por AP20187 y GCV en los dos clones de las células iPS de ratón.** Se representan los datos obtenidos tras la cuantificación de las imágenes de microscopía con QWIN. Se representa la viabilidad celular (ordenadas) en función de la duración del tratamiento correspondiente (abscisas). En A) Células tratadas con AP20187 y en B) Células tratadas con GCV. En todos los casos se muestra con una línea continua el clon con alta expresión de la construcción y con una línea discontinua el clon con baja expresión. Cada punto representa la media de 4 muestras.

**Fig. 14. Muestra los niveles de expresión de la proteína mCherry y del vector IRFP en los tres clones seleccionados para los ensayos *in vivo*.** Mediante FACS se analizaron los niveles de expresión de los dos marcadores. Se seleccionaron los doble positivos para realizar los trasplantes *in vivo*.

**Fig. 15. Muestra la variación de tamaño de los teratomas y tumores durante el tratamiento con AP20187 y GCV.** En abscisas se indican los días transcurridos desde la inyección de las células en los ratones. En ordenadas el tamaño de los tumores en mm<sup>3</sup>. Las flechas cortas en línea continua señalan la administración de GCV a razón de 1,2 mg por inyección (50mg/kg). Las flechas largas y en línea discontinua, la administración de AP20187 a razón de 50 µg por inyección (2mg/kg).

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la construcción génica de la invención o de la composición de la invención en la eliminación selectiva y dirigida de poblaciones celulares diana.

### EJEMPLO 1. EFECTO DEL CASETE SUICIDA EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES.

Para comprobar el correcto funcionamiento del casete suicida pLF1a-Suicida (Hygro)2.0, éste fue transfectado en tres líneas celulares tumorales: PC3 (carcinoma de próstata humano), JAR (Coriocarcinoma humano) y HCT 116 (carcinoma de colon humano).

Una vez obtenidas líneas de expresión constitutiva de mCherry a partir de cada una de las líneas tumorales originales, se analizó en ellas la expresión de la proteína fluorescente mediante "*Fluorescence-activated cell sorting*" (FACS). Se encontró que los niveles de expresión de la construcción, estimados a partir de la fluorescencia de mCherry, variaban de unas líneas a otras al igual que ocurría con el efecto de los tratamientos con Ganciclovir (GVC) y con el dimerizador AP20187 (Tabla 1).

| LINEA CELULAR              | 3 HORAS |         |     | 24 HORAS |         |     | 54 HORAS |         |     |
|----------------------------|---------|---------|-----|----------|---------|-----|----------|---------|-----|
|                            | STS     | AP20187 | GCV | STS      | AP20187 | GCV | STS      | AP20187 | GCV |
| HCT 116 pSuicida-mCherry 1 | 90%     | 70%     | 0%  | 100%     | 50%     | 0%  | 100%     | 20%     | 15% |
| HCT 116 pSuicida-mCherry 2 | 100%    | 80%     | 0%  | 100%     | 70%     | 0%  | 100%     | 20%     | 10% |
| JAR pSuicida-mCherry 1     | 70%     | 30%     | 0%  | 100%     | 30%     | 0%  | 100%     | 10%     | 0%  |
| JAR pSuicida-mCherry 2     | 70%     | 100%    | 0%  | 100%     | 90%     | 0%  | 100%     | 90%     | 0%  |

Tabla 1. Muerte celular observada en las poblaciones celulares con tratamientos de distinta duración con 100nM del dimerizador (AP20187) o 10 $\mu$ M de Ganciclovir (GCV). Staurosporin (STS) se utilizó como control positivo de inducción de muerte celular.

La explicación más plausible de estos resultados es que debido a la naturaleza policlonal de las líneas obtenidas de la transfección, cada una de ellas estaba compuesta por diferentes poblaciones que expresaban las proteínas suicidas a distintos niveles. Consecuentemente, su mortalidad resultó ser muy heterogénea, variando tanto entre las líneas como entre los diferentes clones que constituían cada una de ellas.

En base a estos primeros resultados se decidió aislar, de cada línea, clones celulares con alta y baja expresión de la construcción para, de esta manera, contar con un sistema más limpio donde poder estudiar de una forma precisa la efectividad de los casetes suicidas (Fig. 2). El aislamiento de los clones se llevó a cabo mediante FACS en función de los niveles de fluorescencia emitida por el último elemento del mensajero tricistrónico: la proteína m-Cherry en el caso de pLF1a-Suicida (Hygro)2.0, o mediante tinción con un anticuerpo anti- $\alpha$ NGFR conjugado con FITC en el caso de pSuicida-OL- $\alpha$ NGFR.

Una vez aislados los clones y demostrada su monoclonalidad, en cada uno de ellos se comprobó la expresión basal de las proteínas iCaspasa 9 y TK mediante Western Blot (Fig. 3).

Los resultados exhibieron una clara correlación entre los niveles relativos de las proteínas suicidas y las lecturas de fluorescencia obtenidas por FACS, y demostraron la eficiencia de los elementos 2A en la producción de más de una proteína a partir de un único promotor. Establecido el buen funcionamiento de las construcciones diseñadas, se pasó a evaluar su eficacia como herramientas inductoras de muerte celular. Para ello, los diferentes clones de cada línea celular se trataron con 100nM de AP20187 y 10 $\mu$ M de GCV.

En este ensayo, las células de los clones seleccionados se sembraron en placas de 96 pocillos. El estudio de la muerte celular debida a los diferentes tratamientos se basó en la tinción con *Calcein Green*, un agente de tinción celular que fluoresce en verde únicamente en células vivas. Las imágenes obtenidas con un microscopio Leica DMI6000B (Figs. 4-7), se analizaron y cuantificaron con el programa QWin de Leica (Fig. 8). El programa midió la superficie de cada pocillo que permanecía cubierta de células a diferentes tiempos de tratamiento con cada uno de los dos inductores de muerte celular.

Al analizar los resultados pueden sacarse tres conclusiones principales. La primera, fijándonos en la actividad de la iCaspasa9 (tratamiento con AP20187), es que un menor nivel de expresión del casete suicida se correlaciona con una menor respuesta a la muerte inducida. Esto indica que la cantidad de proteína iCasp9 presente en la célula de forma constitutiva es fundamental para el funcionamiento del sistema suicida, y que este dato debe tenerse muy en cuenta a la hora de su aplicación clínica. En las tres líneas celulares tratamientos de entre 1 y 3 horas con el dimerizador son suficientes para eliminar las células de los clones que presentan un nivel alto de expresión del casete suicida, pero sólo al 50% cuando se trata de células de clones del mismo tipo celular con bajo nivel de expresión.

La segunda conclusión es que el efecto de la administración de GCV empieza a sentirse mucho más tarde que el de la administración de AP20187. Por ejemplo, hay que tratar al menos 24 horas con GCV para que alrededor del 50% de las células de clones con nivel de expresión alto mueran. Las diferencias observadas entre los dos tratamientos se deben principalmente a que las proteínas suicidas correspondientes actúan en dos sistemas diferentes: inducción de la muerte celular por apoptosis en el caso del AP20187 e inducción de la muerte por senescencia inducida por daño en el ADN en el caso del GCV. Además, en el caso de la TK, no se detecta una diferencia de comportamiento tan clara entre clones con alta y baja expresión como la que se observa con la iCaspasa. Esto último puede observarse con claridad en las células HCT pSuicida-mCherry donde la diferencia de expresión entre los clones de alta y baja expresión no es muy grande.

La tercera es que con los tratamientos *in vitro* de AP20187 o GCV por separado no se consigue eliminar todas las células. Existe un porcentaje de células que por alguna razón se hacen resistentes al tratamiento.

Son precisamente estas células resistentes la diana principal del casete suicida de la invención. Para explorar su comportamiento se realizó un estudio con las tres líneas celulares, en el que se contabilizó manualmente el número de colonias resistentes obtenidas por cada millón de células sembradas tras 10 días de tratamiento con el dimerizador AP20187, con GCV o con ambos tratamientos a la vez. La prolongación del experimento tenía por objeto observar la evolución de las células resistentes a largo plazo.

De nuevo se observó la diferencia ya detectada entre clones de alta y de baja expresión. En los primeros no aparecieron colonias de células resistentes, mientras que en los segundos los resultados indicaron que el número de colonias resistentes obtenidas tras el doble tratamiento era menor que con los dos tratamientos por separado (Fig. 9). En este



experimento se realizó una sola administración al inicio del tratamiento. En el caso del doble tratamiento ambos compuestos se añadieron de manera simultánea. Teniendo en cuenta que en la práctica clínica no siempre es posible proceder a la selección de clones de alta expresión, la existencia de un mecanismo que reduzca el riesgo de aparición de colonias celulares resistentes al tratamiento representa un notable incremento en la seguridad del sistema.

## EJEMPLO 2. TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS IPS.

Una vez que se comprobó *in vitro* el correcto funcionamiento del nuevo casete suicida en líneas celulares tumorales, el siguiente paso fue su aplicación a células madre pluripotentes inducidas (iPS). Se utilizó una línea iPSC de ratón (M625.2 D4). Las células iPSC fueron transfectadas con el casete pSuicida-mCherry, cuyos niveles de expresión fueron analizados mediante FACS (Fig. 10). Esta vez se aislaron directamente los clones con alta y baja expresión de la construcción en función de los niveles de fluorescencia de la proteína mCherry. En este caso, anticipando los estudios *in vivo*, las células iPS fueron además transfectadas con un vector de expresión de proteína fluorescente infrarroja (pIRV3), de manera que los clones dobles positivos, IRFP y mCherry, fueran detectables una vez trasplantados a un animal.

La caracterización de los dos clones de células iPS de ratón se completó con el estudio mediante Western Blot de los niveles de expresión constitutiva de las proteínas suicidas transgénicas (Fig. 11).

Una vez establecidas las dos líneas celulares como líneas estables que expresan la construcción suicida, se realizó el ensayo *in vitro* en placa de 96 para comprobar la efectividad del sistema siguiendo el esquema detallado anteriormente para las células tumorales. En la figura 12 se muestran las imágenes tomadas mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*. La figura 13 muestra la cuantificación de las mismas imágenes mediante el programa QWin de Leica.

De esta manera se comprobó que el sistema suicida funciona tanto en células tumorales como en células madre pluripotentes inducidas. De nuevo, se observa que el tratamiento con el dimerizador tiene un efecto más rápido que el GCV, aunque las células iPS parecen tener mayor sensibilidad al GCV.

## EJEMPLO 3. ENSAYO *IN VIVO*: TRASPLANTE DE CÉLULAS TRANSFECTADAS.

En su conjunto, los resultados obtenidos *in vitro* demostraron la funcionalidad de la construcción, tanto en las diferentes líneas celulares tumorales humanas como en las células murinas iPS. Así mismo, pusieron de manifiesto la correlación existente entre el nivel de expresión basal de la construcción suicida y su eficacia a la hora de eliminar las células portadoras. Por último, se pudo observar cómo el tratamiento doble era más eficaz que los otros dos tratamientos por separado a la hora de prevenir la aparición de colonias resistentes.

Para comprobar la validez de estas observaciones y la posible aplicación de la nueva construcción a la práctica clínica, se procedió a continuación a determinar su eficacia en experimentos *in vivo*.

El principal objetivo de este ensayo fue comprobar si era posible eliminar, de forma selectiva, células previamente trasplantadas. Se seleccionaron tres de las cuatro líneas celulares estables generadas y caracterizadas en los ejemplos anteriores: HCT 116, JAR y M625.2 D4.

En un experimento *in vivo* la exposición de las células al tratamiento es mucho menor que la que se puede alcanzar *in vitro*. Con frecuencia, las condiciones de riego sanguíneo y la complejidad de la estructura tridimensional en la que se encuentran hacen muy difícil el acceso de los compuestos que se prueban al tejido o célula diana. Para establecer las condiciones más restrictivas posibles a la hora de establecer comparaciones entre la efectividad de los tratamientos individuales con GCV o AP20187 y el tratamiento combinado, GCV+ AP20187, se decidió emplear los clones de alta expresión, que en los experimentos *in vitro* prácticamente no habían presentado diferencias entre sí. Los experimentos se realizaron con las líneas HCT 116 y JAR humanas y la línea M625.2 D4 de células iPS de ratón. A las líneas humanas se les introdujo un vector infrarrojo (pIRV3) para poder realizar un seguimiento de las células trasplantadas. En la Fig. 14 se muestran los niveles de expresión del infrarrojo en cada uno de los clones seleccionados.

Como receptores se emplearon ratones *nude* Foxn1<sup>nu/nu</sup> irradiados con 4G para provocar un cuadro de inmunosupresión. Las células se inyectaron subcutáneamente (100  $\mu$ l) en los flancos de los receptores, a razón de  $1 \times 10^6$  células por inyección. Se emplearon un total de 24 ratones por línea, divididos en 4 grupos experimentales: controles (inyectados con medio sin células, (PBS)), animales inyectado con células y tratados solo con AP20187 (1mg/kg, disuelto en 4% etanol, 10% PEG-400 y 86% PBS-2% Tween), animales inyectados con células y tratados solo con GCV (50mg/kg en dosis de 12,5mg/ml en PBS cada 2 días), y animales inyectados con células y tratados con AP20187 y GCV simultáneamente. Los tratamientos se administraron por inyección intraperitoneal una vez comprobada la aparición de tumores. Cada dos días se realizó la medida de los tumores. En la figura 15 se presentan las gráficas que recogen la variación del tamaño de los tumores (teratoma en el caso de la células iPS) durante los tratamientos.

Tanto el tratamiento con AP20187 como con GCV retrasaron el crecimiento de los tumores, pero lo realmente importante es que el tratamiento combinado con los dos reactivos mejoró a cada uno de ellos por separado deteniendo completamente el crecimiento tumoral, e incluso. llegando en algunos casos a reducirlo.

5 Es importante tener en cuenta que la efectividad del tratamiento *in vivo* depende de muchos factores como del acceso del tumor al riego sanguíneo, la dosificación, vía de administración, etc. Modificando estas variables será posible mejorar notablemente la eficacia del tratamiento.

## REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica policistrónica que comprende:
  - a. un promotor génico preferiblemente de origen eucariótico,
  - b. un intrón, preferiblemente el de la beta-globina,
  - c. una secuencia nucleotídica codificante para la proteína icaspasa9,
  - d. un primer elemento iniciador o continuador de la traducción, preferiblemente del tipo 2A,
  - e. una secuencia nucleotídica codificante para la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex,
  - f. un segundo elemento iniciador o continuador de la traducción, preferiblemente del tipo 2A, y
  - g. preferiblemente al menos un gen marcador.
2. La construcción génica según la reivindicación 1, donde los elementos (a) a (g) se encuentran dispuestos en sentido 5'-3' en dicha construcción.
3. Un vector de expresión que comprende la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
4. Una célula o población celular aislada que comprende la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o el vector de expresión según la reivindicación 3.
5. La célula o población celular según la reivindicación 4, donde dicha célula o población celular es eucariota, preferiblemente humana.
6. La célula o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, donde dicha célula o población celular es una célula o población celular del sistema inmune, preferiblemente un linfocito T o población de linfocitos T.
7. La célula o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, donde dicha célula o población celular es tumoral o una célula madre o población de células madre.
8. Composición que comprende:
  - i. la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, el vector de expresión según la reivindicación 3 o la célula o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7,
  - ii. un sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex, y
  - iii. un activador de la proteína icaspasa9.
9. Composición según la reivindicación 8, donde el sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex es Ganciclovir, Aciclovir, AZT, Stavudine, Idoxuridine o FIAU (1-(2-desoxi-2-fluoro-1-D-arabinofuranosido)-5-iodouracil), preferiblemente Ganciclovir.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, donde el activador de la proteína icaspasa9 es AP20187 o AP1903, preferiblemente AP20187.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que es una composición farmacéutica, donde dicha composición farmacéutica preferiblemente comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, el vector de expresión según la reivindicación 3, la célula o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su uso como medicamento.
13. La construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, el vector de expresión según la reivindicación 3, la célula o población celular según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su uso en el tratamiento y/o prevención de tumores, de la enfermedad injerto contra huésped o de rechazo a trasplante.
14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde el sustrato de la proteína timidina kinasa del virus del herpes simplex y el activador de la proteína icaspasa9 se administran de manera simultánea.
15. Método *in vitro* para obtener células útiles para un trasplante que comprende:
  - a. transfectar las células a ser trasplantadas con la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 o con el vector de expresión según la reivindicación 3, y
  - b. cultivar dichas células transfectadas hasta obtener un número suficiente para un trasplante.

Fig. 1

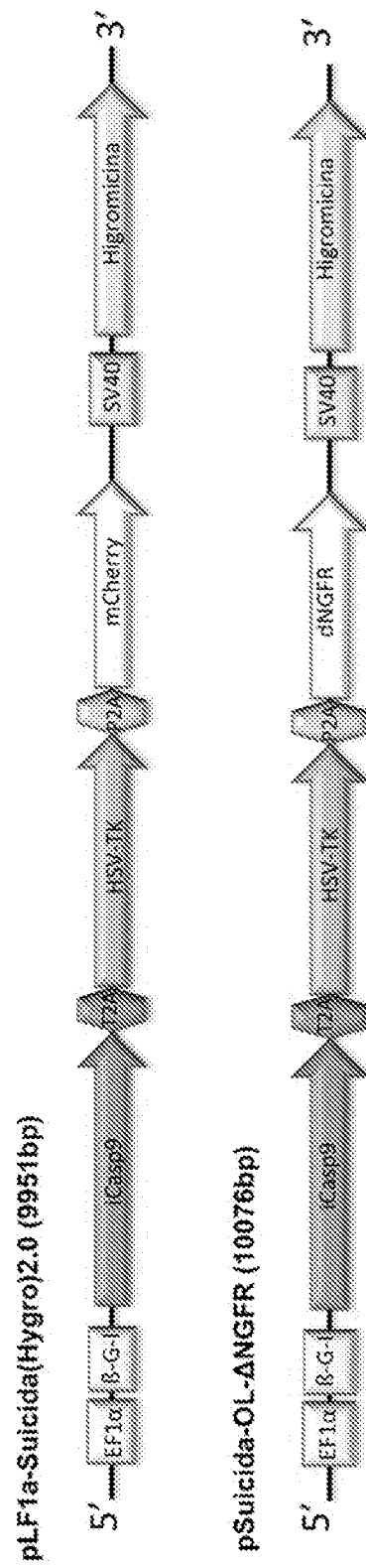


Fig. 2

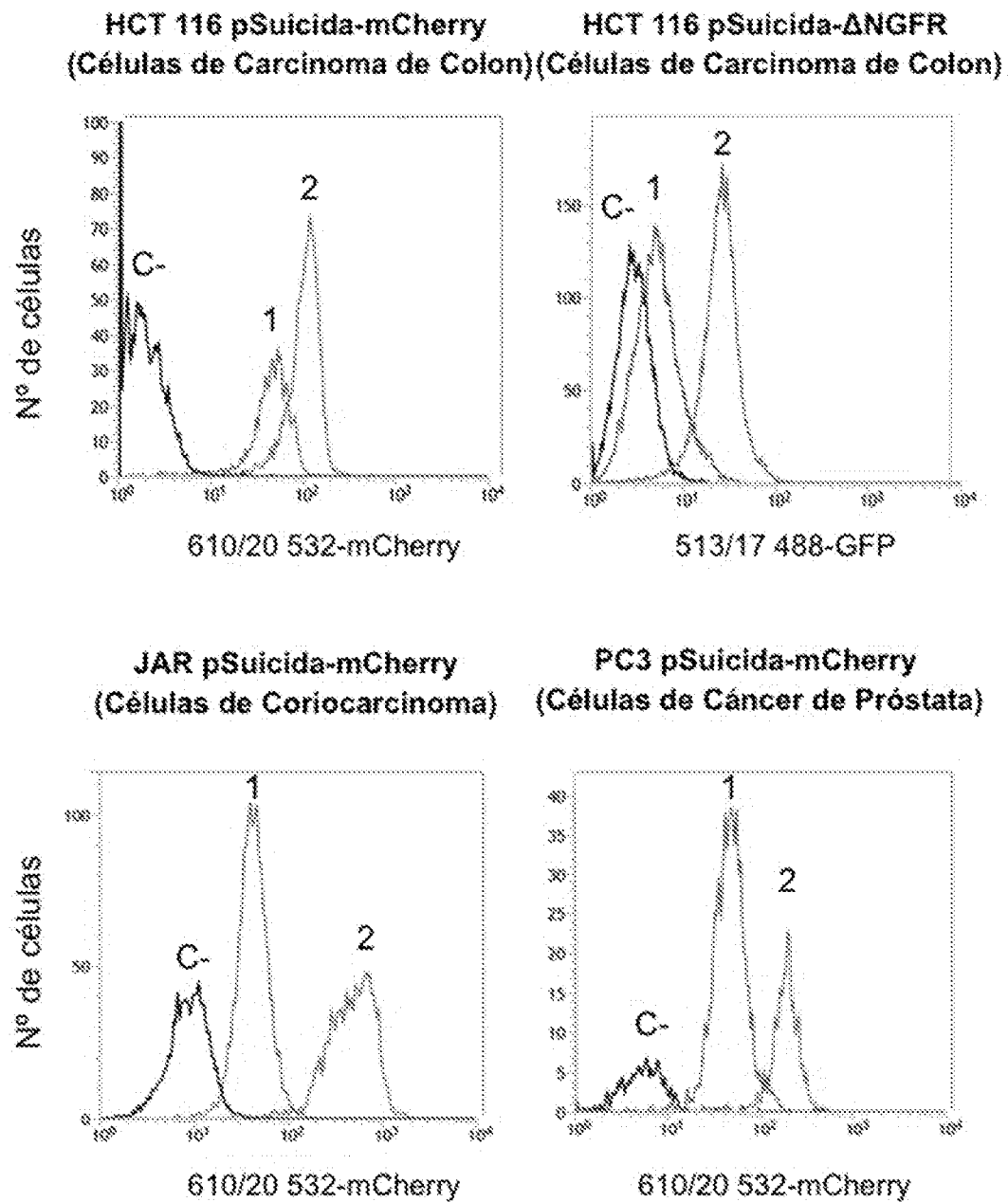


Fig. 3

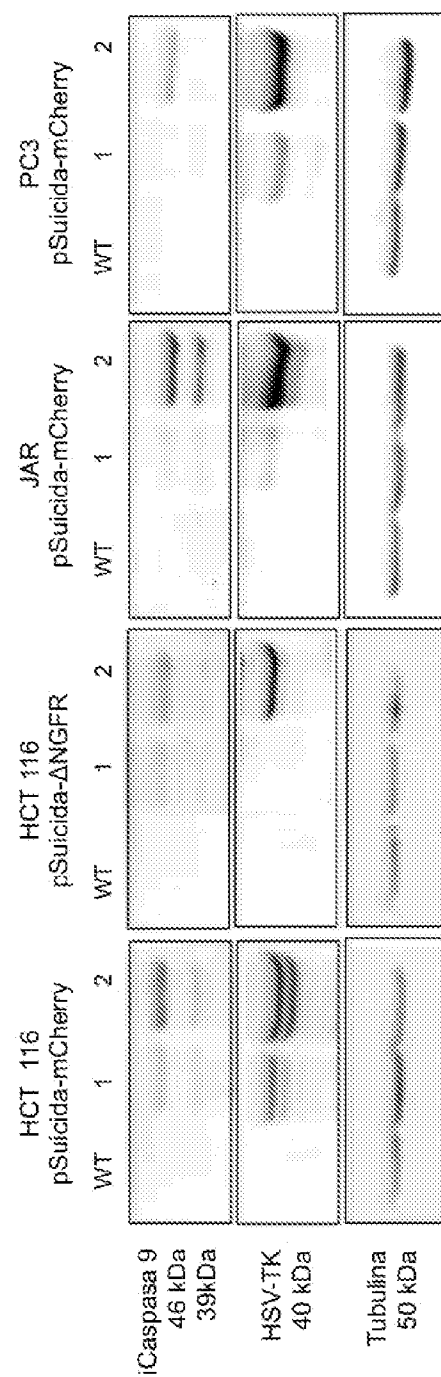


Fig. 4

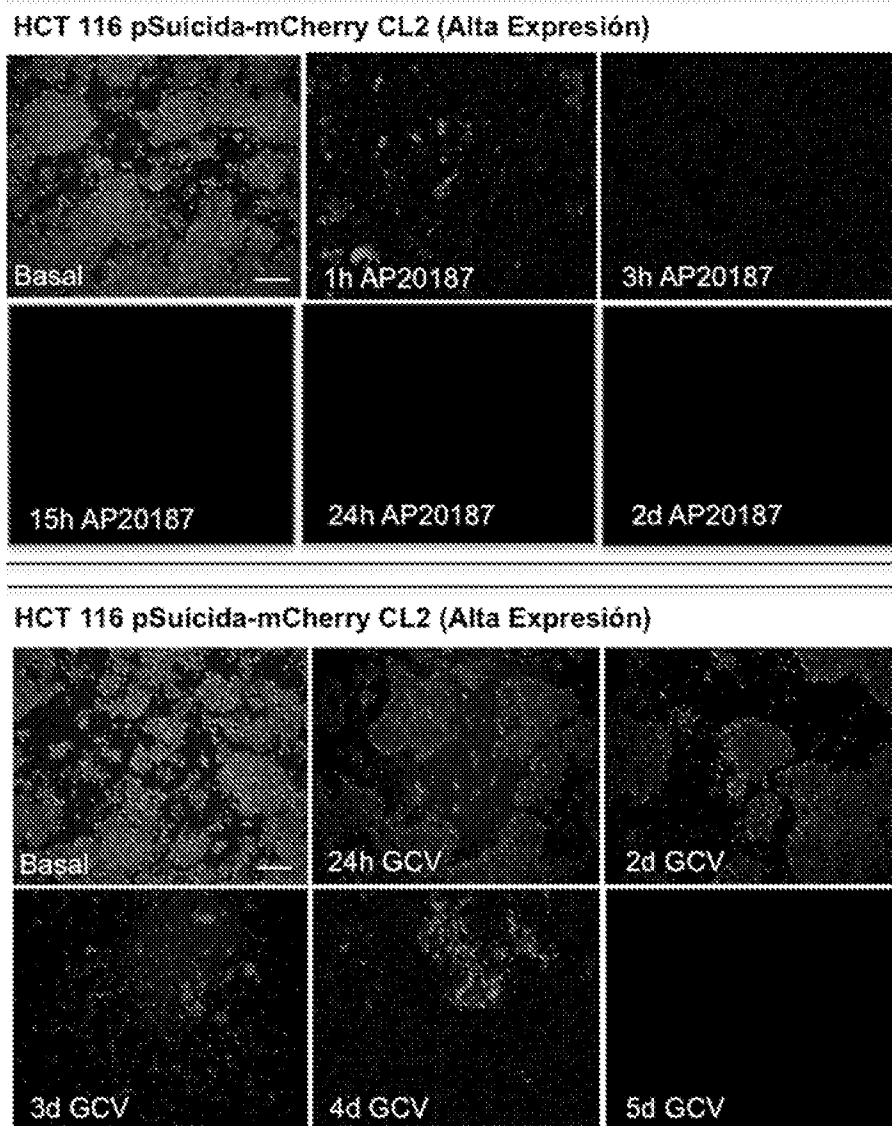
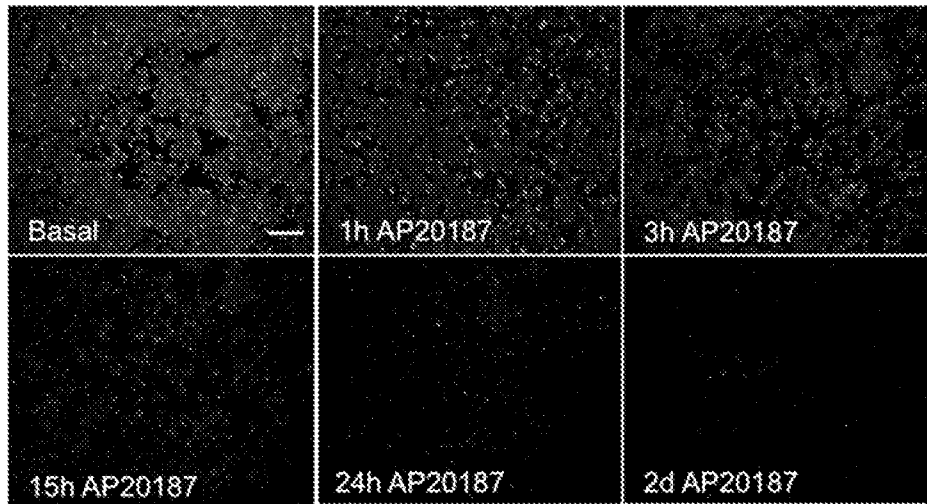


Fig. 4 (cont.)

HCT 116 pSuicida-mCherry CL1 (Baja Expresión)



HCT 116 pSuicida-mCherry CL1 (Baja Expresión)

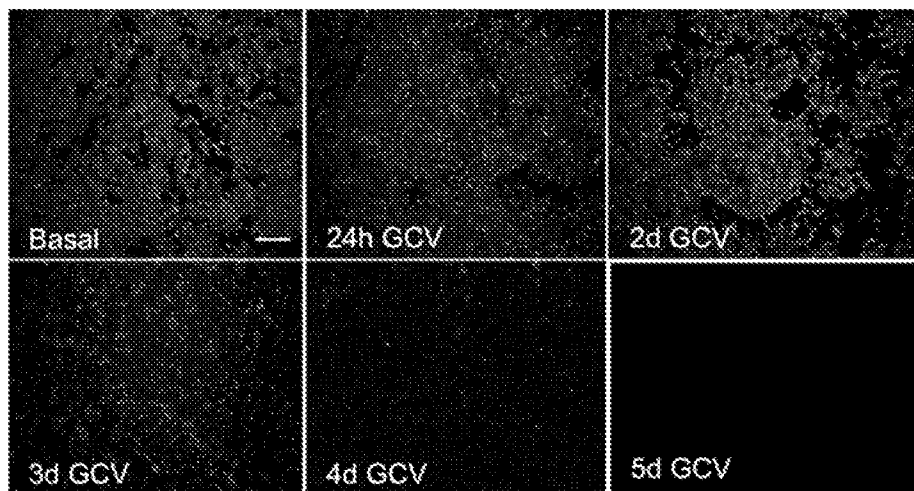




Fig. 5

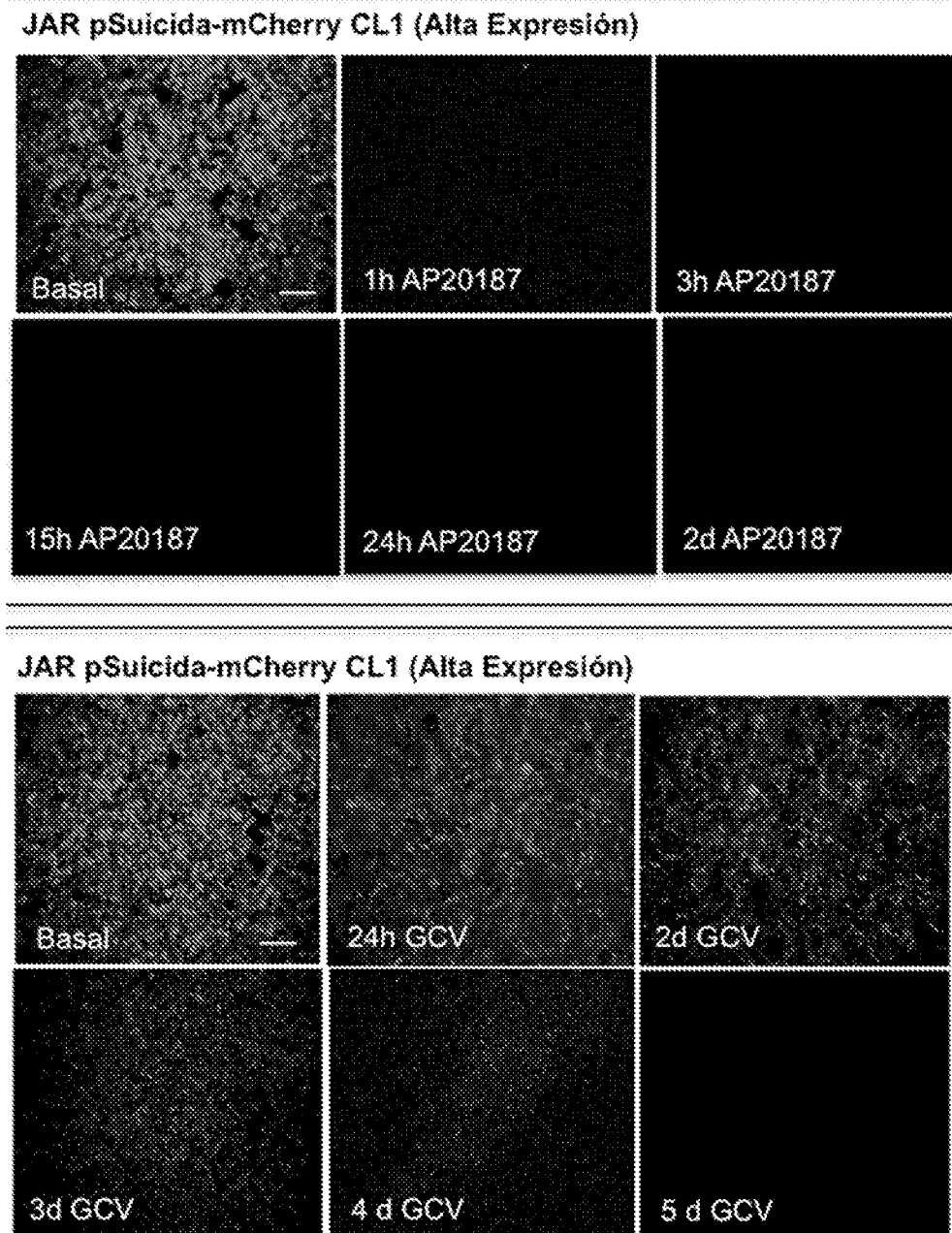
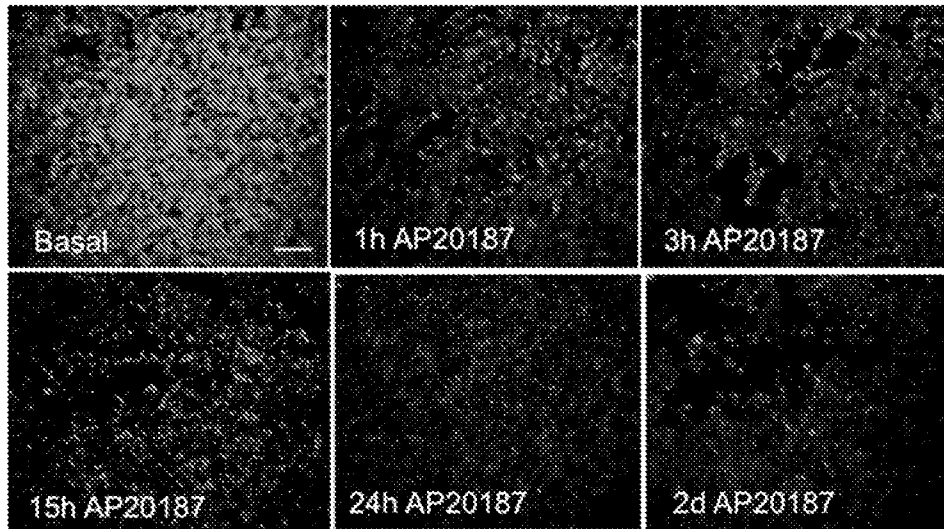


Fig. 5 (cont.)

**JAR pSuicida-mCherry CL2 (Baja Expresión)**



**JAR pSuicida-mCherry CL2 (Baja Expresión)**

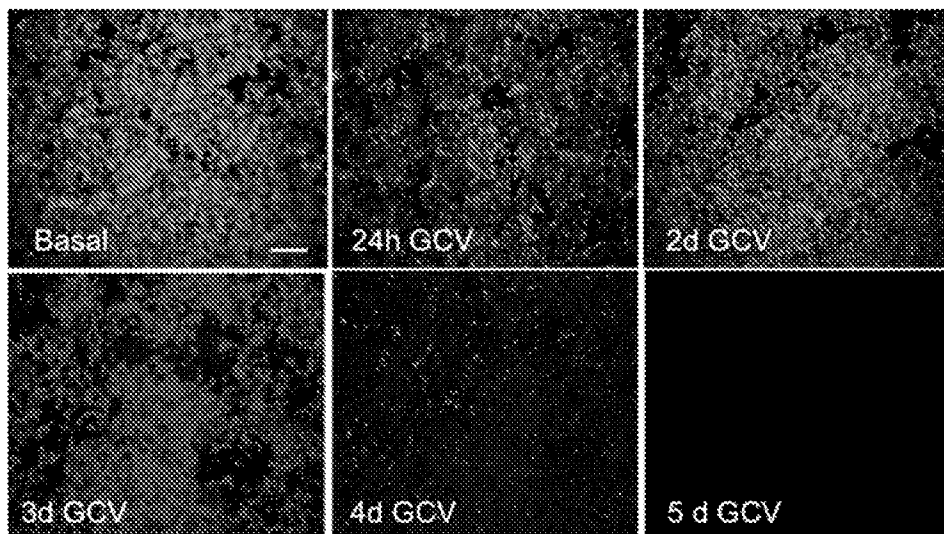


Fig. 6

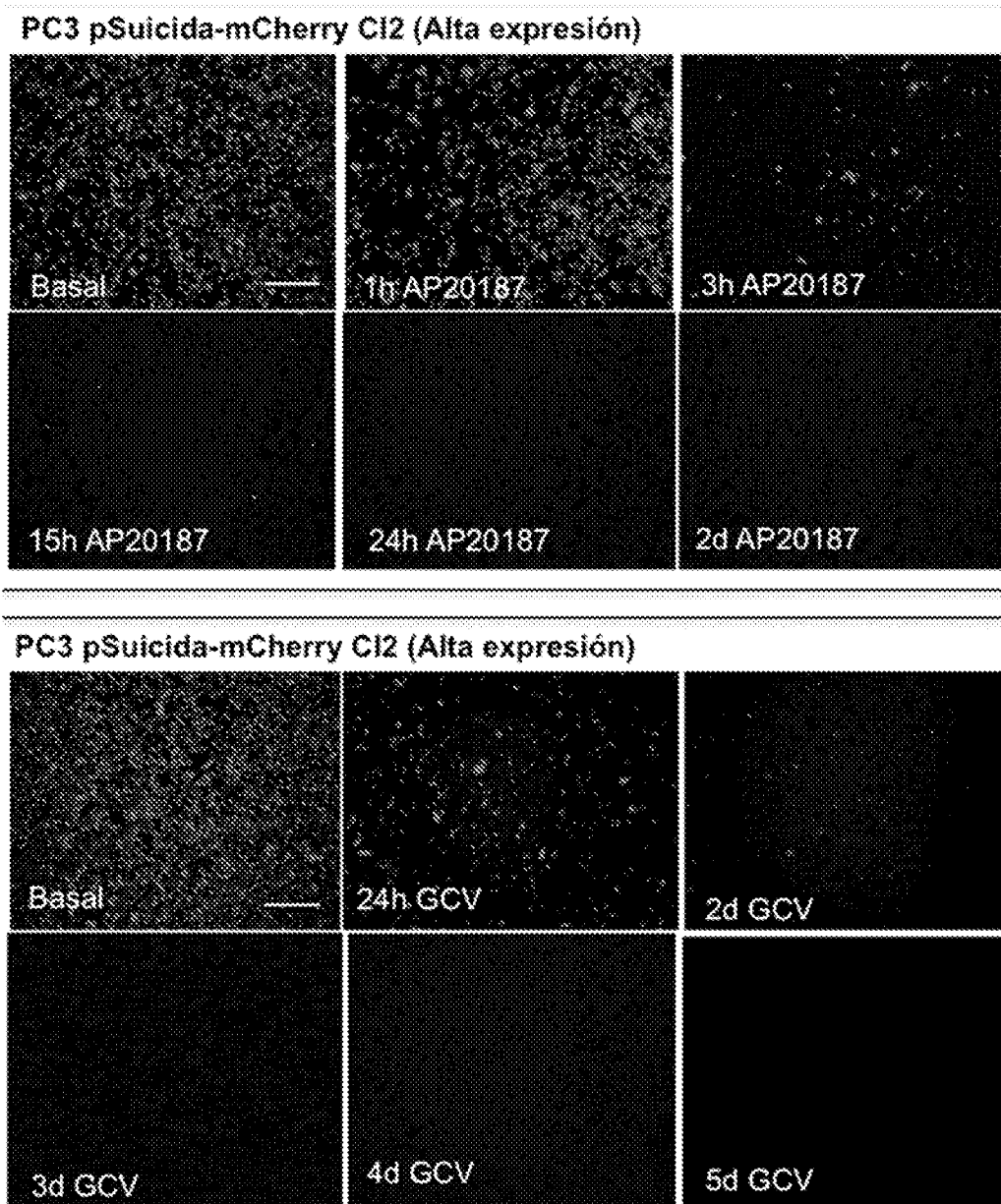
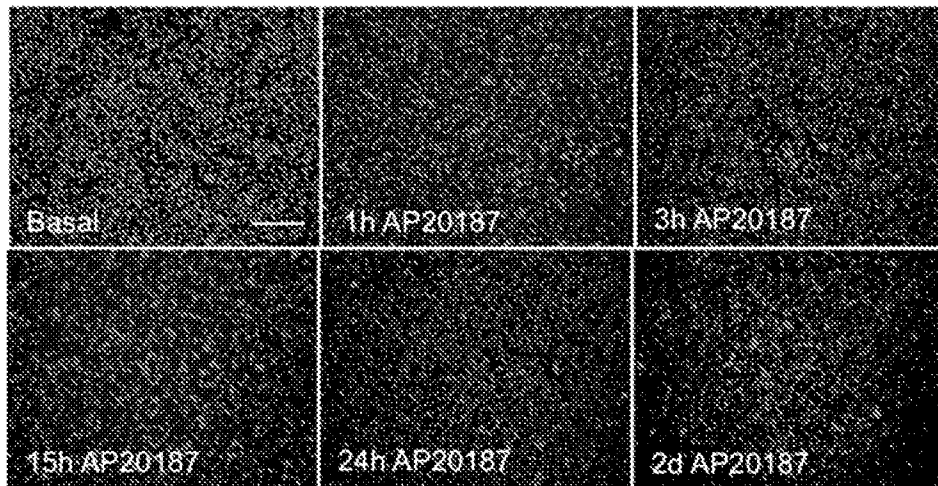


Fig. 6 (cont.)

**PC3 pSuicida-mCherry CI7 (Baja expresión)**



**PC3 pSuicida-mCherry CI7 (Baja expresión)**

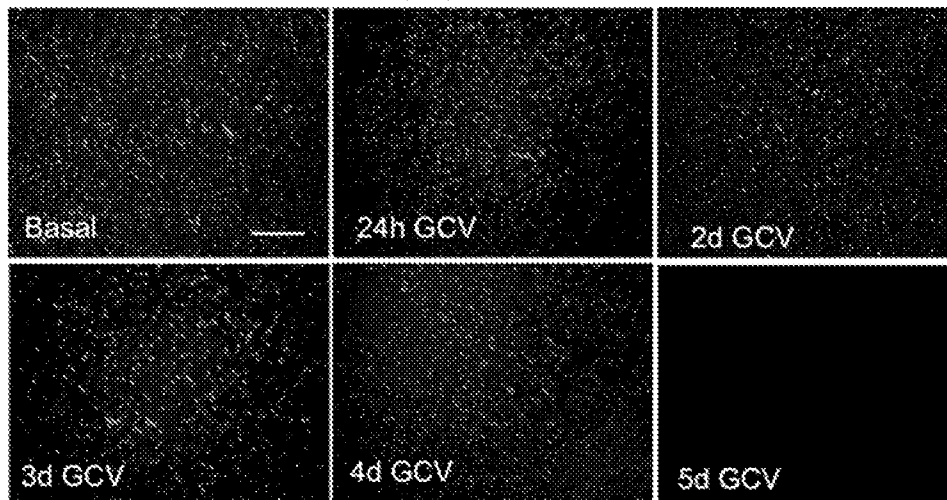
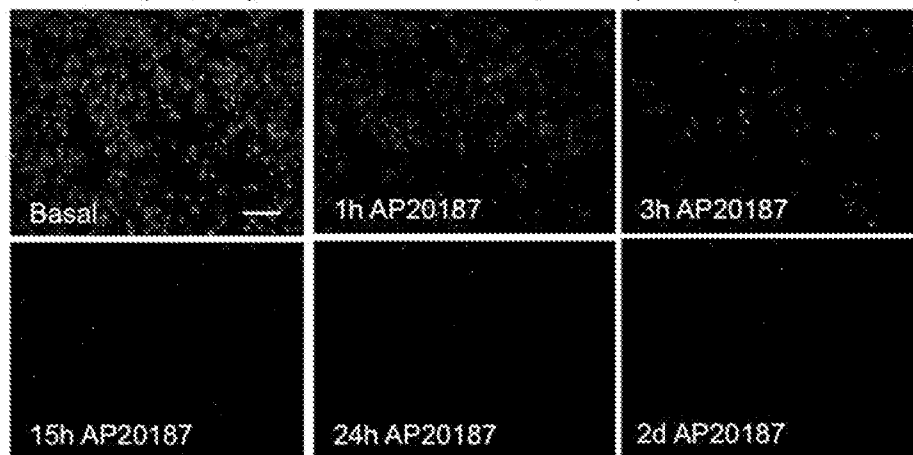


Fig. 7

HCT 116 p53 +/+ pSuicida-ΔNGFR CL2 (Alta Expresión)



HCT 116 p53 +/+ pSuicida-ΔNGFR CL2 (Alta Expresión)

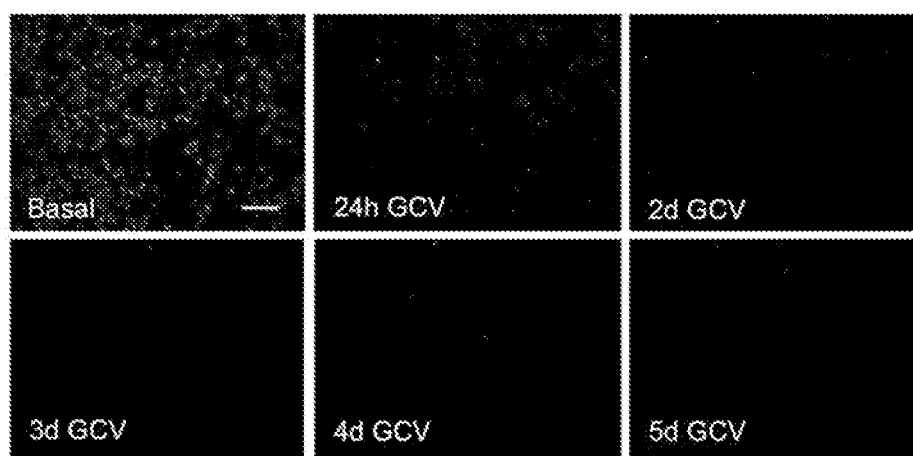
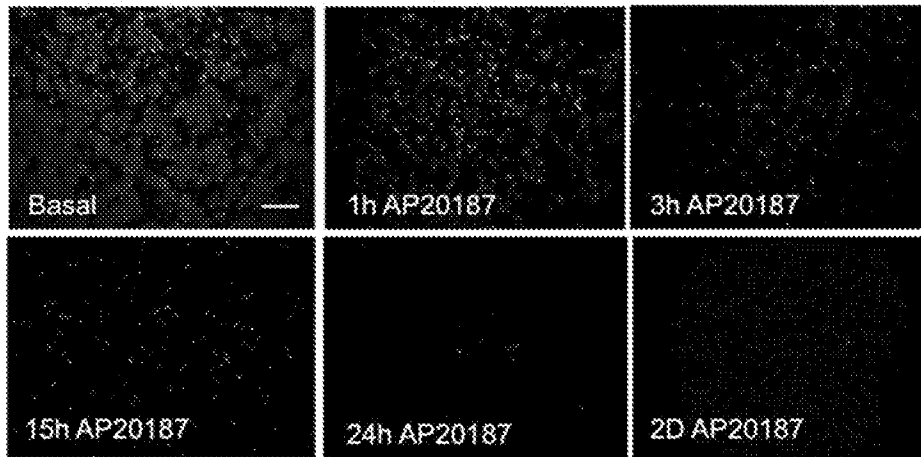


Fig. 7 (cont.)

**HCT 116 pSuicida- $\Delta$ NGFR CL1 (Baja Expresión)**



**HCT 116 pSuicida- $\Delta$ NGFR CL1 (Baja Expresión)**

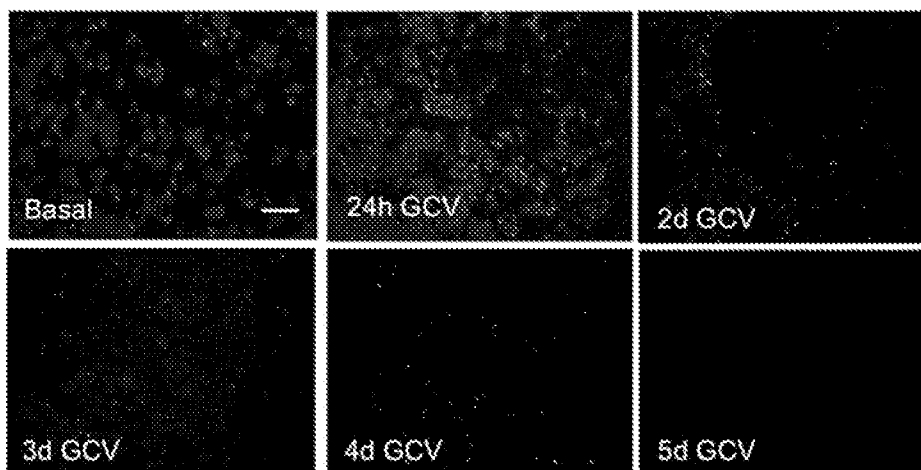


Fig. 8

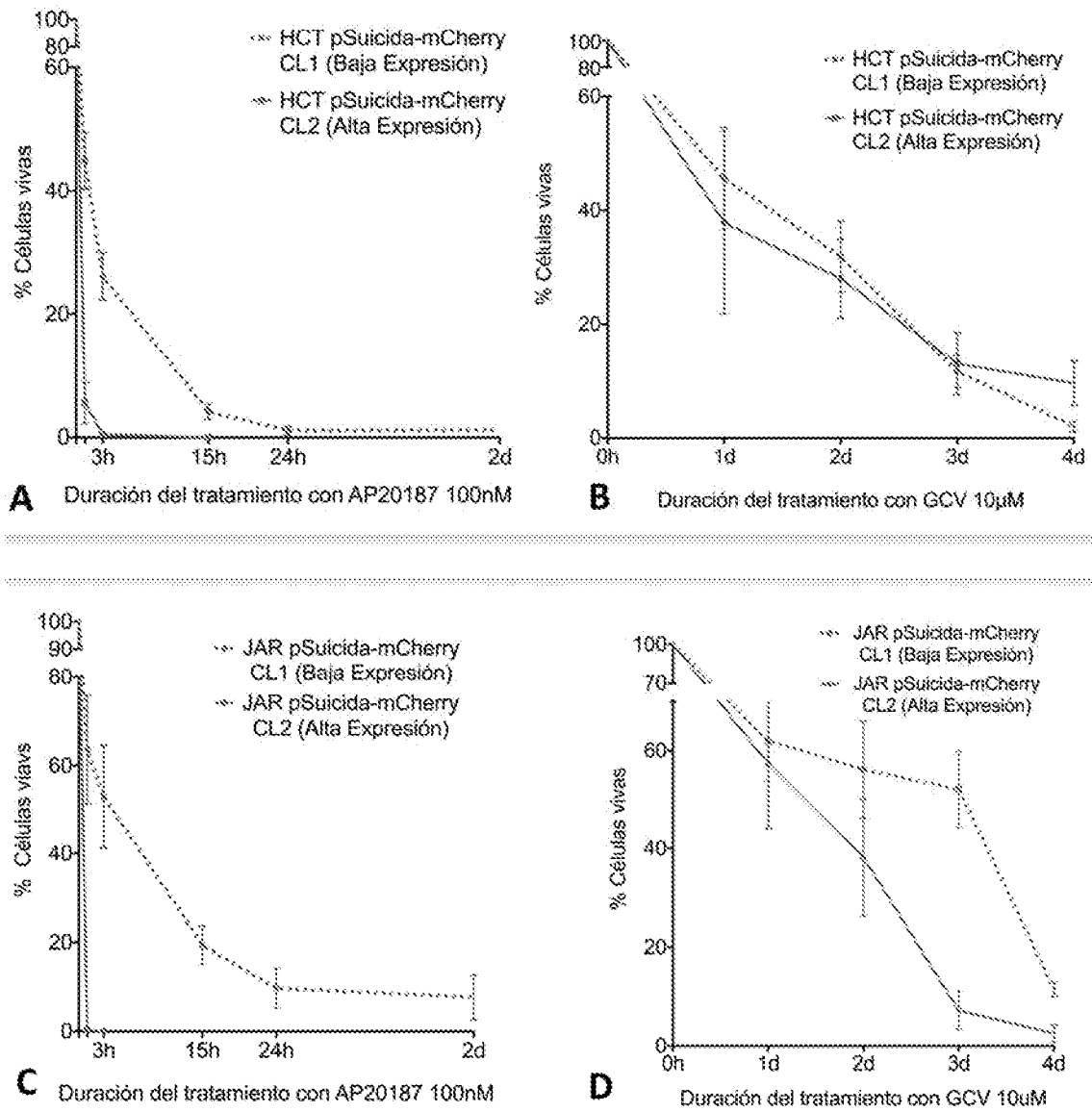


Fig. 8 (cont.)

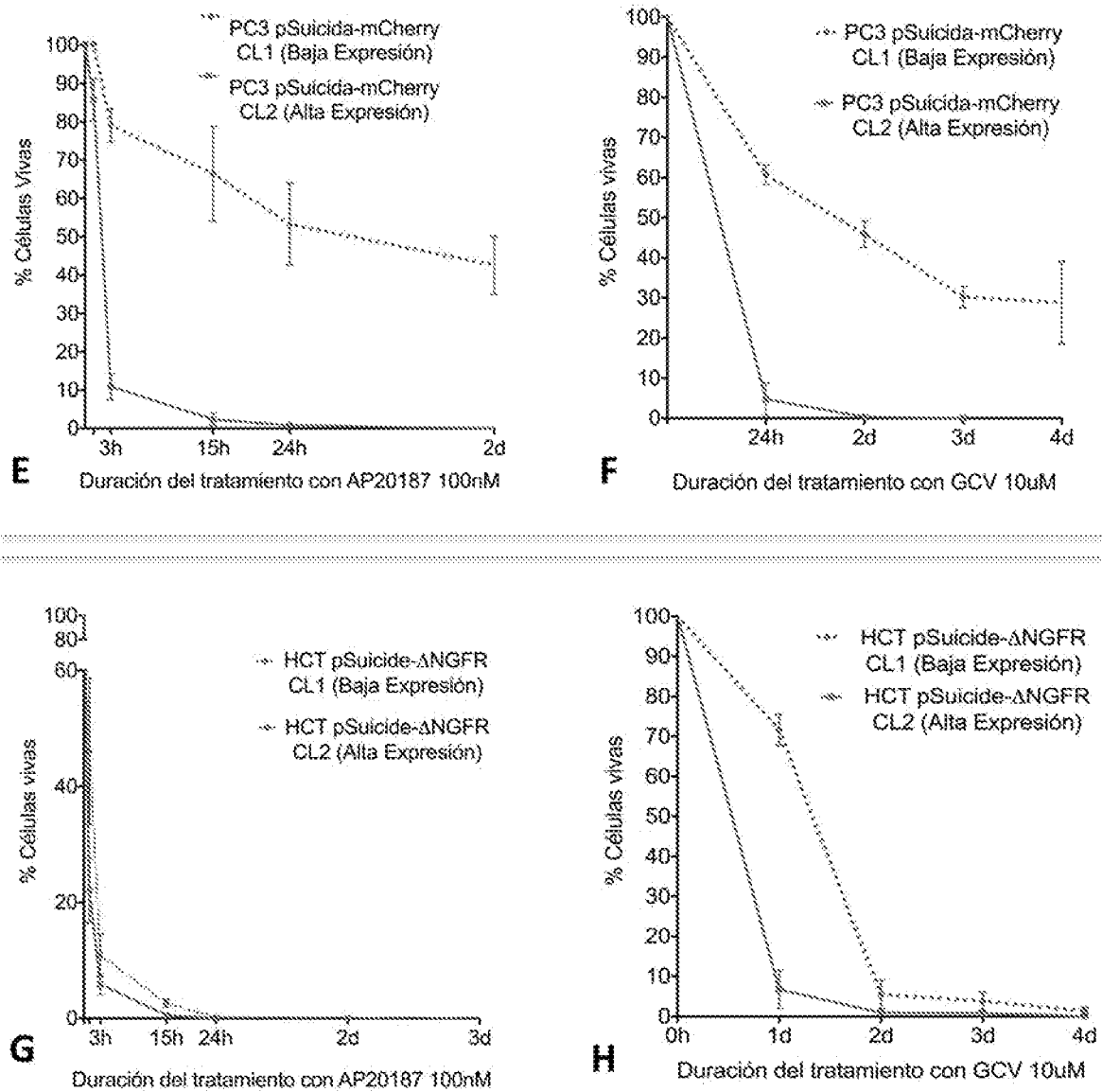




Fig. 9

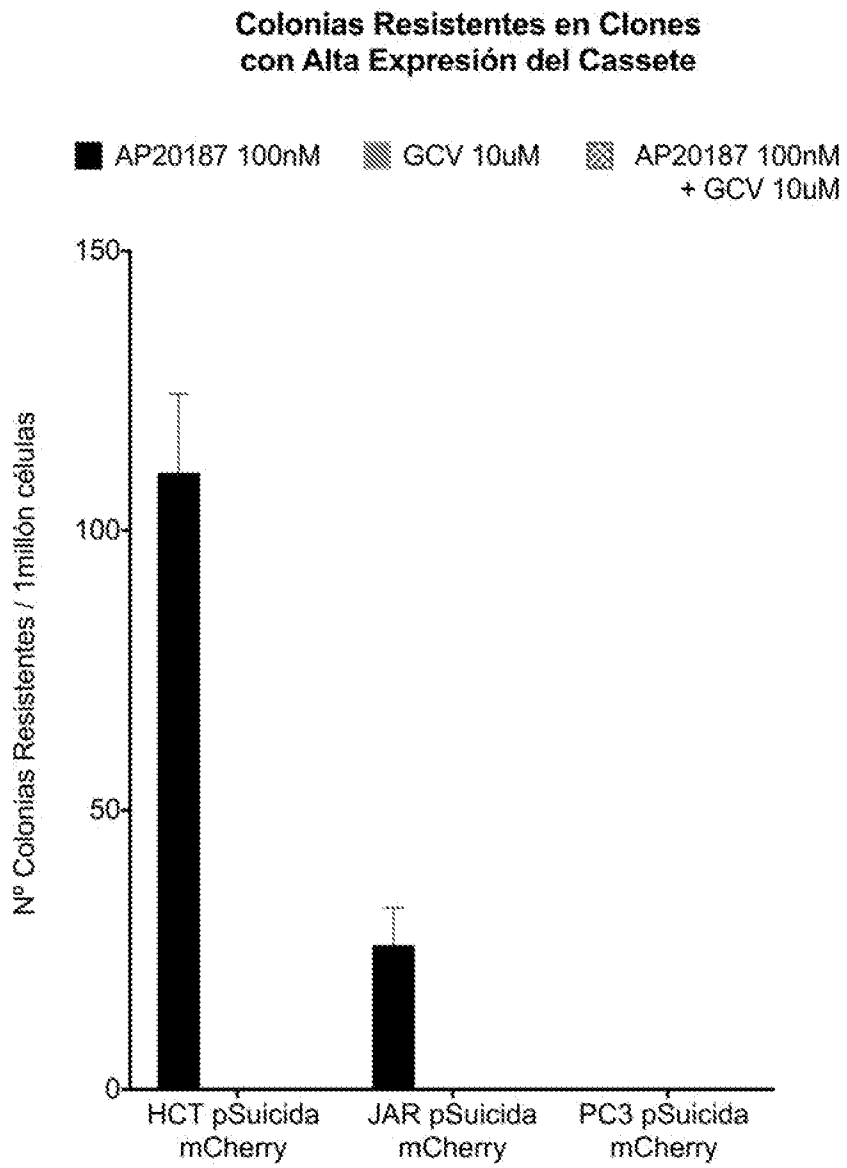


Fig. 9 (cont.)

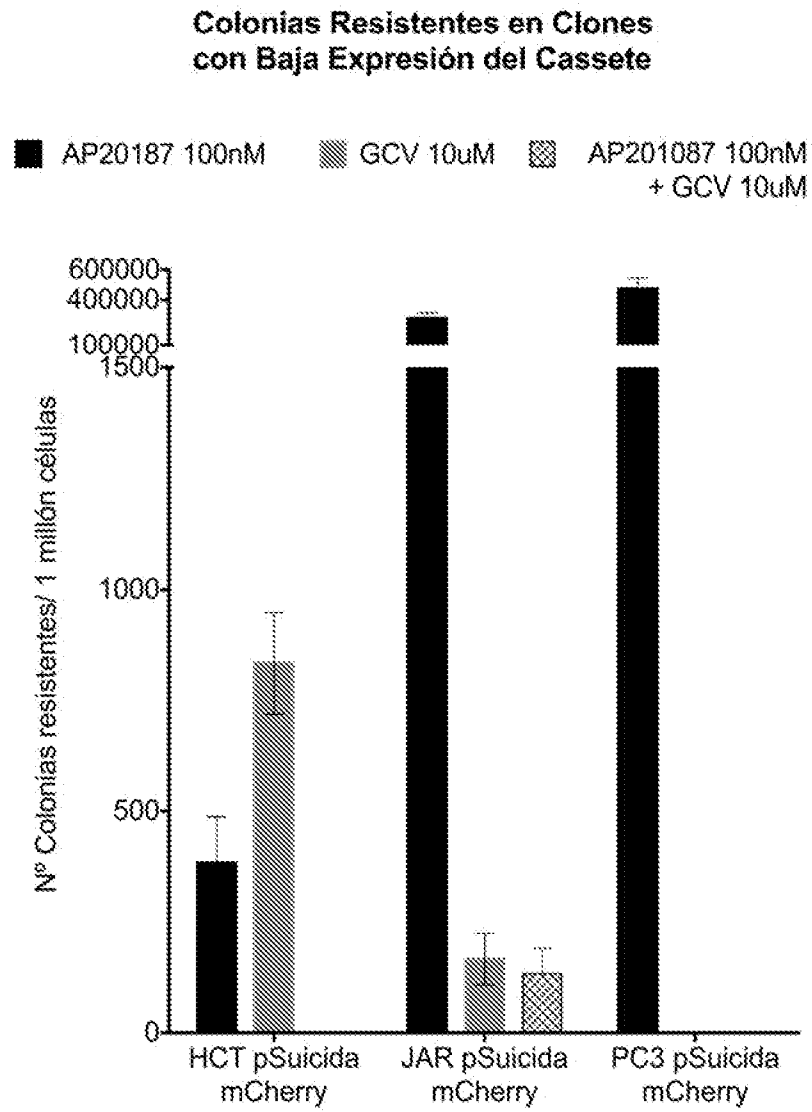


Fig. 10

Células iPS M625.2 D4 pSuícida-mCherry

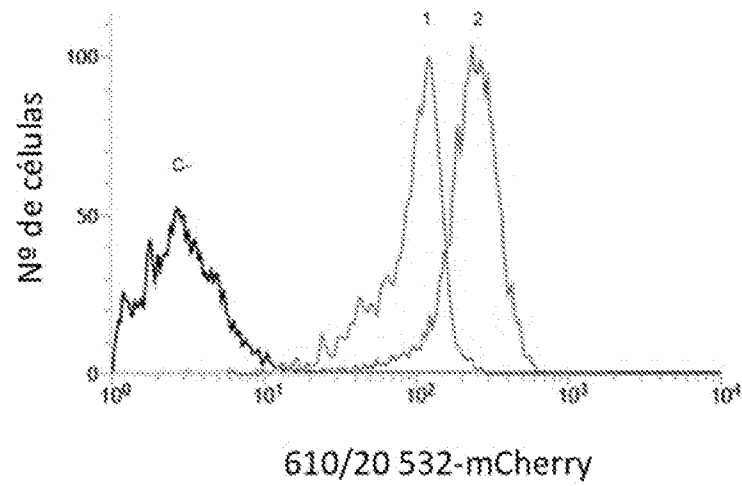


Fig. 11

Células iPS M625.2 D4  
pSuícida-mCherry

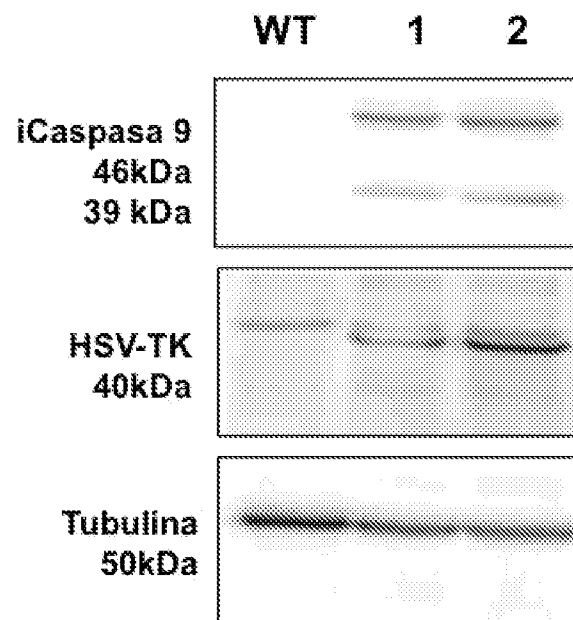
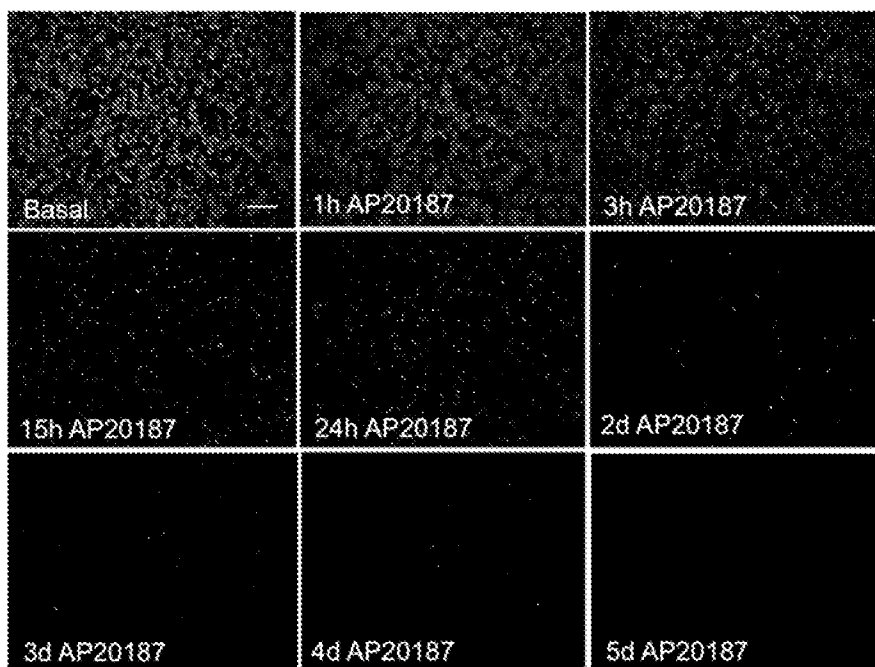


Fig. 12

Células iPSM625.2 D4 pSuicida-mCherry CL14 (Alta Expresión)



Células iPSM625.2 D4 pSuicida-mCherry CL14 (Alta Expresión)

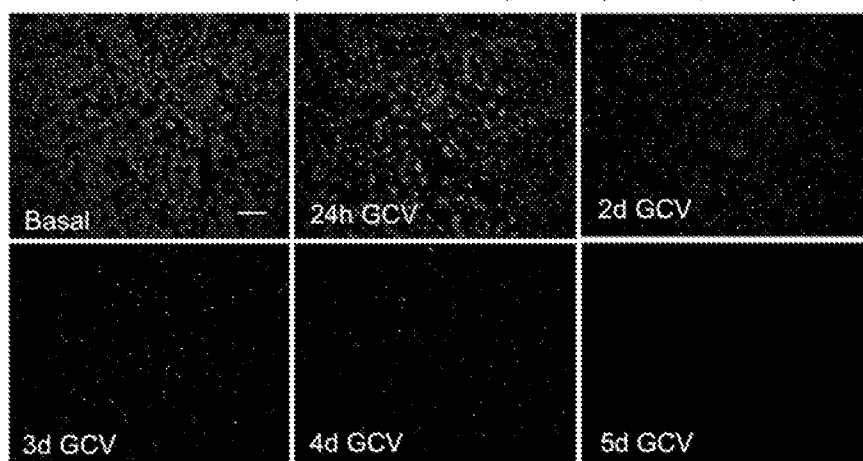
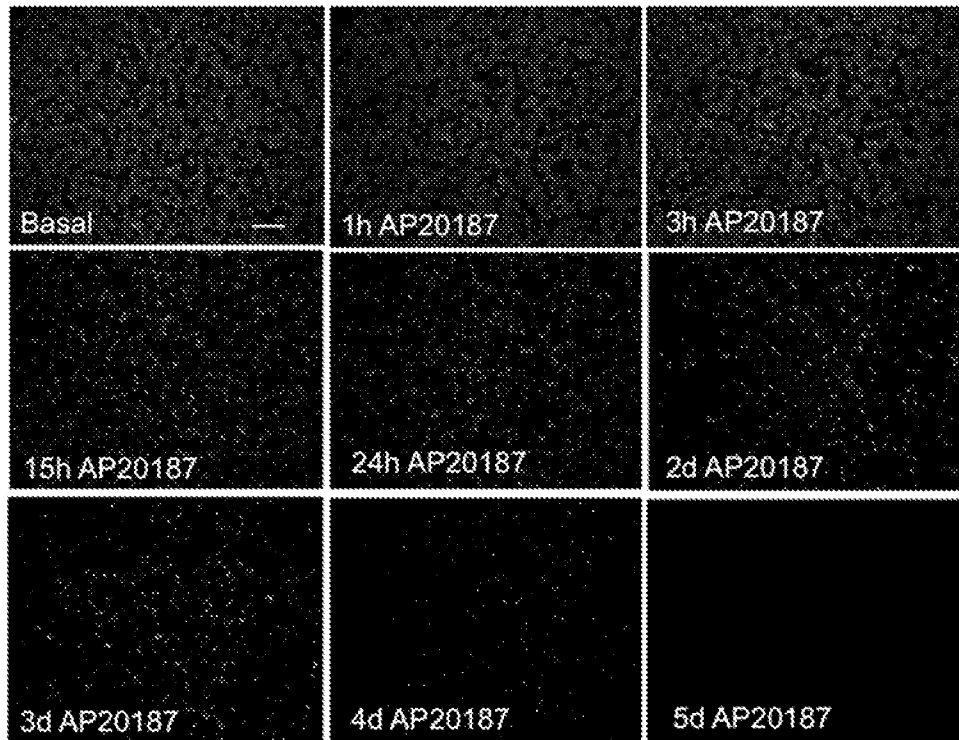


Fig. 12 (cont.)

**Células iPSM625.2 D4 pSuicida-mCherry CL2 (Baja Expresión)**



**Células iPSM625.2 D4 pSuicida-mCherry CL2 (Baja Expresión)**

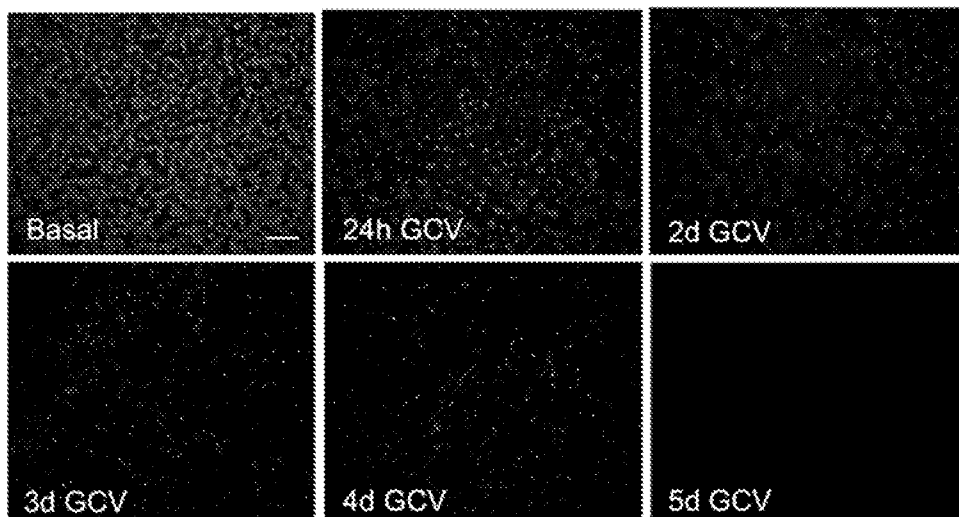


Fig. 13

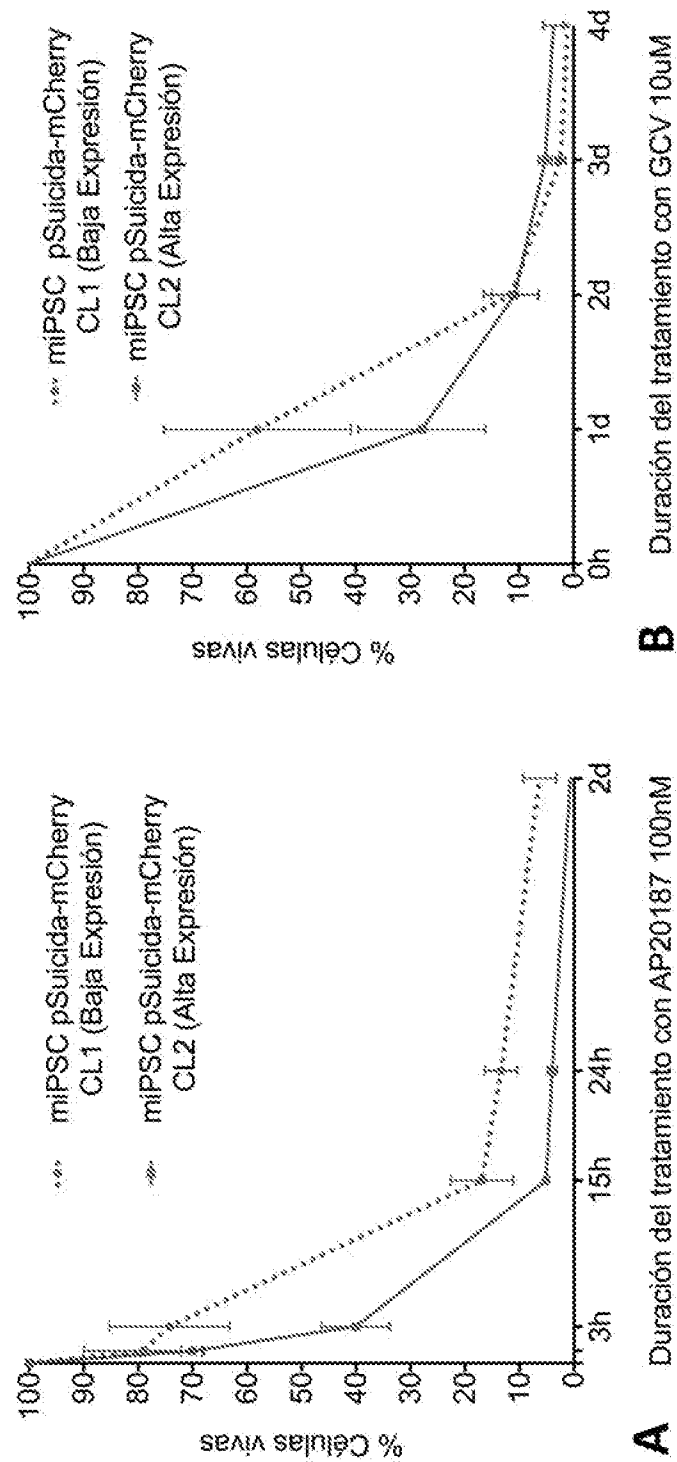
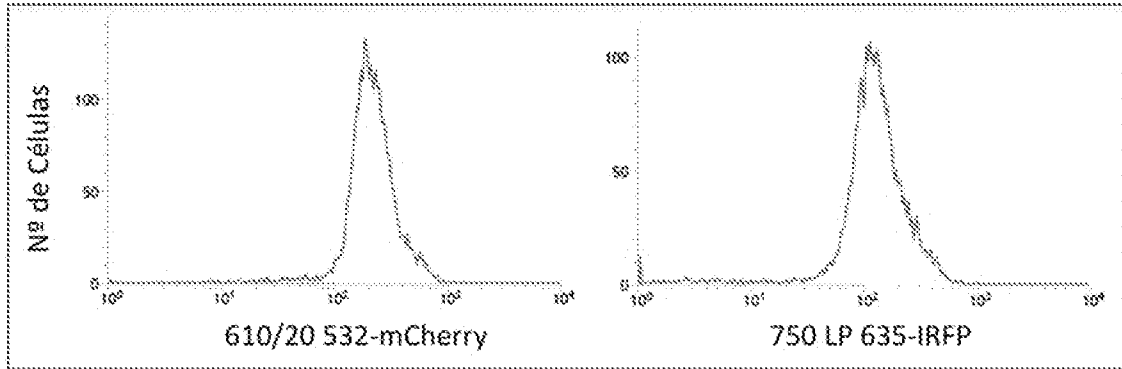
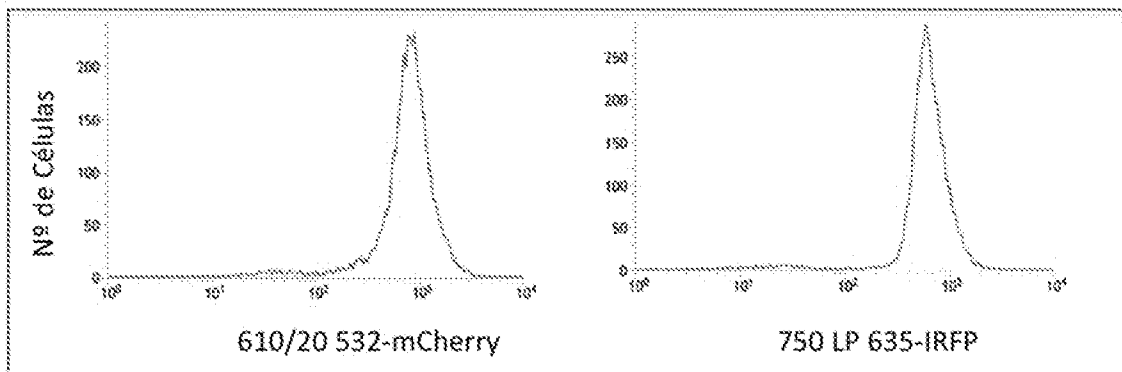


Fig. 14

**HCT 116 pSuicida-mCherry (CL2)-IRFP (CL5)**



**JAR pSuicida-mCherry (CL1)-IRFP (CL5)**



**M625.2 D4 IRFP-pSuicida- mCherry (CL14)**

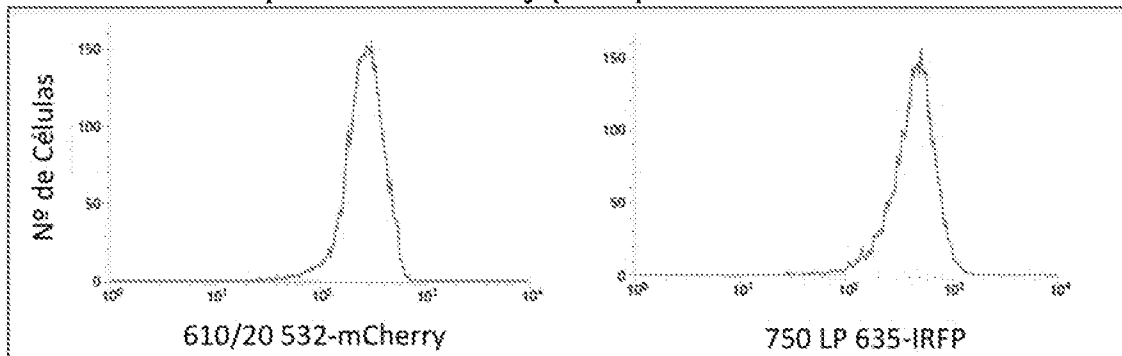


Fig. 15

A. Crecimiento tumoral de células JAR

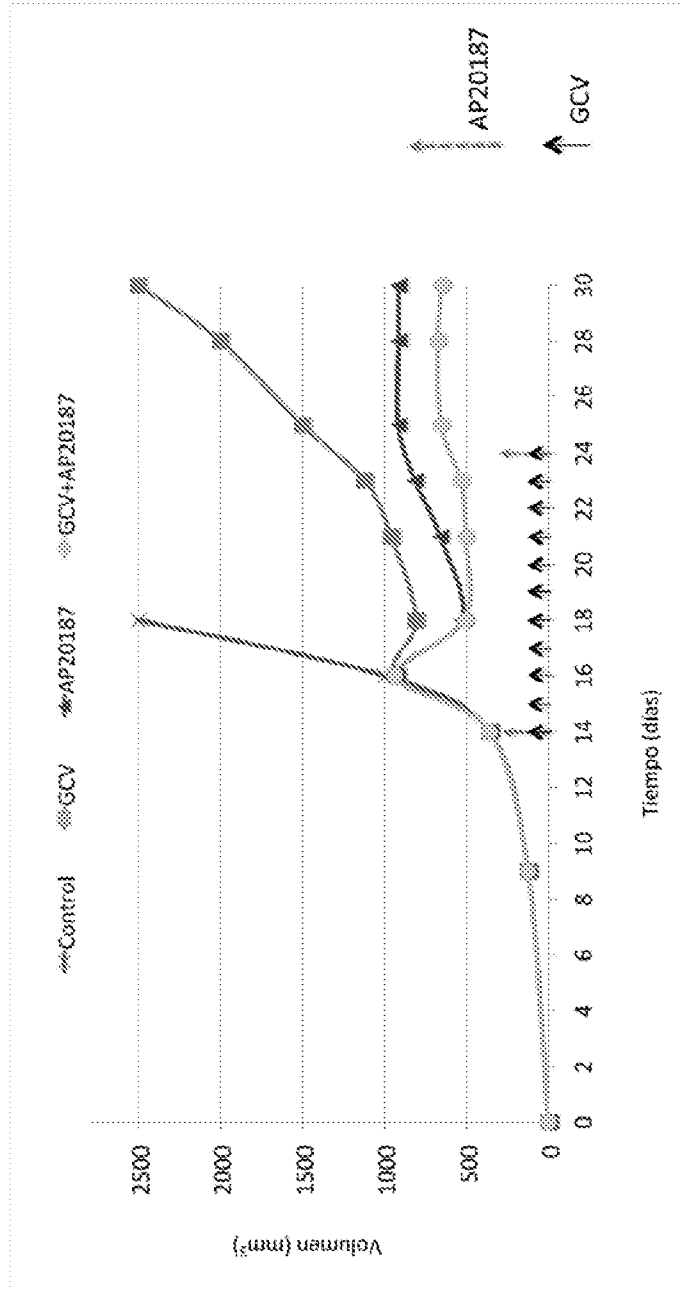




Fig. 15 (cont.)

**B. Crecimiento tumoral de células HCT 116**

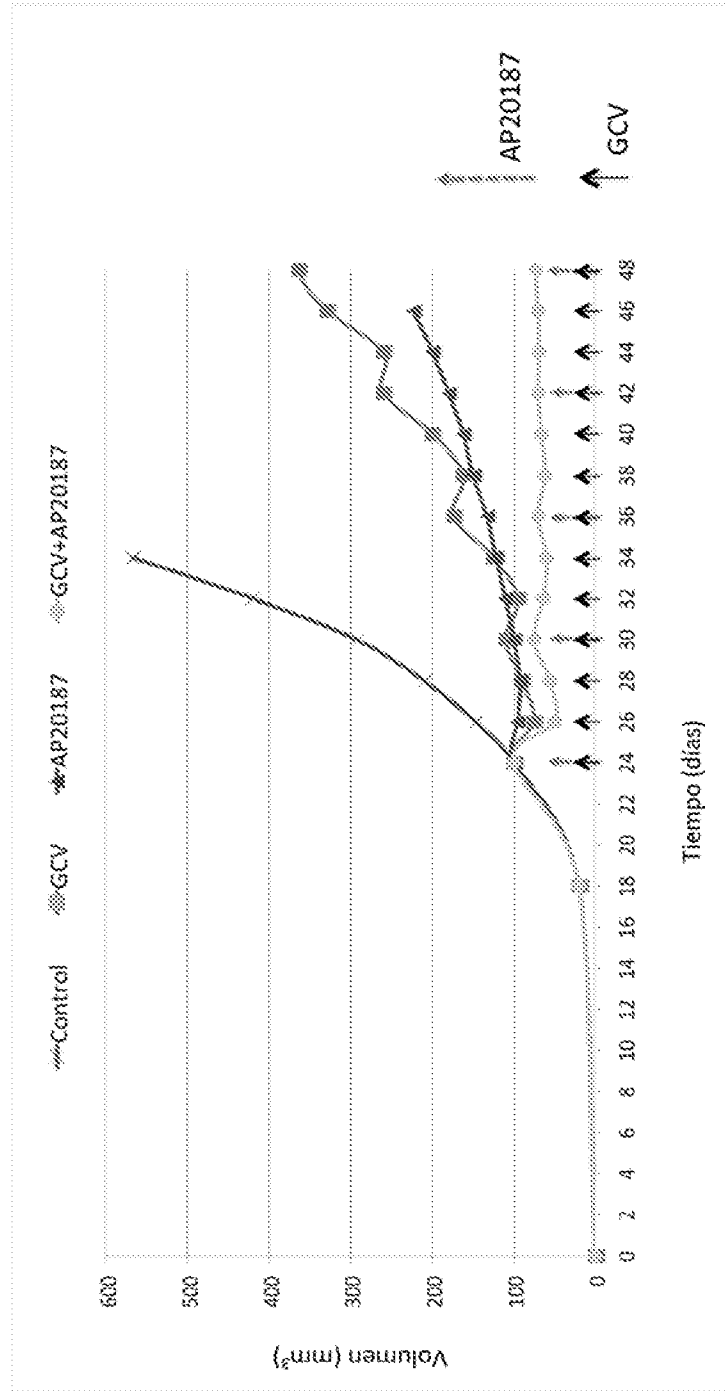


Fig. 15 (cont.)

### C. Crecimiento tumoral de células iPS de ratón

