



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 531**

(51) Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96944760 .6**

(86) Fecha de presentación : **13.12.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0883344**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.1998**

(54) Título: **Moléculas terapéuticas generadas por corte y empalme en trans.**

(30) Prioridad: **15.12.1995 US 8717 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

(73) Titular/es: **Intronn, Inc.**
9700 Great Seneca Highway
Rockville, Maryland 20850, US

(72) Inventor/es: **Mitchell, Lloyd, G.**

(74) Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Moléculas terapéuticas generadas por corte y empalme en trans.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico para expresar un gen heterólogo en un subconjunto seleccionado de células. Las moléculas de ácido nucleico de la invención participan en una reacción de corte y empalme en trans seleccionada como diana o definida con moléculas de pre-ARNm que se expresan únicamente en las células diana específicas. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser ARN, ADN u otros análogos de ácidos nucleicos tales como ácido nucleico peptídico (ANP). La reacción de corte y empalme en trans *in vivo* puede proporcionar una molécula terapéutica activa que puede expresarse en las células diana. El producto de expresión del ARNm puede ser una proteína de valor terapéutico para la célula, o una toxina que mata las células específicas. Alternativamente, el ARN terapéutico (ARN-t) u otra molécula pueden realizar por sí mismos una función terapéutica. En otra realización de la invención pueden usarse múltiples moléculas de ácido nucleico de la invención en combinación para lograr un efecto terapéutico.

20 Descripción de la técnica relacionada

Uno de los mayores desafíos en el tratamiento de muchos estados patológicos potencialmente mortales, tales como cáncer y SIDA, es la administración de una molécula terapéutica a las células diana específicas sin administrar la misma molécula a otras células en el organismo. Los esfuerzos previos para resolver este problema han incluido terapia génica con vectores víricos, administración de fármacos o toxinas conjugados con anticuerpos monoclonales, y otros. Hasta la fecha estos métodos no han sido completamente eficaces.

El método de la presente invención no requiere la administración sólo a las células seleccionadas como diana. La molécula precursora de la molécula terapéutica puede administrarse a todas las células del organismo, y puede captarse por todas las células del organismo, pero el ARNm terapéutico sólo se crea *in vivo* en las células diana específicas. La especificidad de este tratamiento depende de la transcripción única (restringida) del pre-ARNm diana en las células diana. Las células normales (no seleccionadas como diana) no transcribirán (o transcribirán sólo mínimamente) el gen diana. Por lo tanto, la creación selectiva de la molécula terapéutica no tendrá lugar en tales células normales (o tendrá lugar sólo en un grado muy mínimo).

Una forma importante en la que las células eucarióticas del mismo organismo se diferencian una de otra, a pesar de la virtual identidad del contenido génico, es que expresan genes o partes de esos genes diferentes. Esta regulación de la expresión génica funciona a muchos niveles; los estudios clásicos sobre expresión génica demuestran el control en el nivel de transcripción y traducción. Trabajos más recientes indican que las células tienen también la capacidad de regular la expresión génica mediante el número de copias génicas y regulación del corte y empalme.

Los genes, almacenados como secuencias de ADN en el cromosoma, se transcriben para dar pre-ARNm que contienen regiones codificantes (exones) y generalmente contienen también regiones no codificantes intermedias (intrones). El pre-ARNm se trata en el núcleo, eliminando los intrones, junto con cualquier exón no deseado. Los exones restantes se cortan y empalman juntos, formando un ARNm, que se exporta desde el núcleo hasta el citoplasma para su traducción para dar una proteína por los ribosomas. Véase, por ejemplo, Moore, M.J., C.C. Query, y P.A. Sharp, Cell, 77:805-815 (1994); Moore, M.J., C.C. Query, y P.A. Sharp, The RNA World, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 303-358, (1993).

Los intrones se eliminan de los pre-ARNm en un proceso preciso denominado corte y empalme. Chow, L.T., R.E. Gelinas, T.R. Broker, R.J. Roberts, (1977) Cell, 12, 1-8; y Berget, S.M., C. Moore y P.A. Sharp (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3171-3175. El corte y empalme de pre-ARNm avanza mediante un mecanismo de dos etapas. En la primera etapa, se escinde el sitio de corte y empalme en 5', dando como resultado un exón en 5' "libre" y un intermedio de lazo. (Moore, M.J. y P.A. Sharp, Nature, 365:364-368, 1993). El nucleótido en 5' del intrón (normalmente guanina) forma el intermedio de lazo a través de un enlace 2',5'-fosfodiéster con el nucleótido del punto de ramificación (normalmente adenosina) en el intrón. En la segunda etapa, el exón en 5' se liga con el exón en 3' con liberación del intrón como el producto de lazo. Estas etapas se catalizan en un complejo de proteínas y ribonucleoproteínas nucleares pequeñas denominado espliceosoma (Moore *et al.*, The RNA World, ed. Gesteland y Atkins, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993, páginas 303 a 352).

Los sitios de la reacción de corte y empalme de trans-esterificación se definen por secuencias consenso alrededor de los sitios de corte y empalme en 5' y 3'. La secuencia consenso del sitio de corte y empalme en 5' es AG/GURAGU (en la que A = adenosina, U = uracilo, G = guanina, C = citosina, R = purina y / = sitio de corte y empalme). Moore *et al.*, The RNA World, página 308. Los nucleótidos subrayados son comunes a casi todos los intrones de pre-ARNm, siendo una rara excepción GC sustituido en lugar de GU. El sitio de corte y empalme en 3' consiste en tres elementos de secuencia separados: el punto de ramificación o sitio de ramificación, una extensión de polipirimidina y la secuencia consenso en 3'. Estos elementos definen aproximadamente una región de sitio de corte y empalme en 3', que puede abarcar 100 nucleótidos del intrón en sentido 5' del sitio de corte y empalme en 3'. La secuencia consenso del punto de

ramificación en mamíferos es YNCUGAC (en la que N = cualquier nucleótido, Y = pirimidina). La A subrayada es el sitio de formación de la ramificación (el BPA = adenosina del punto de ramificación). La secuencia consenso de corte y empalme en 3' es YAG/G. Entre el punto de ramificación y el sitio de corte y empalme se encuentra normalmente una extensión de polipirimidina, que es importante en sistemas de mamíferos para la utilización eficaz del punto de ramificación y el reconocimiento del sitio de corte y empalme en 3' (Roscigno, H., M. Weiner y M.A. García-Blanco, J. Biol. Chem. 268, 14, 11222-11229, 1993). El primer dinucleótido YAG en sentido 3' del punto de ramificación y la extensión de polipirimidina es el sitio de corte y empalme en 3' usado más comúnmente. Smith, C.W.J., E.B. Porro, J.G. Patton y B. Nadal-Ginand (1989) Nature 342, 243-247.

10 Corte y empalme en *cis* frente *trans*

Normalmente los exones se ligan a otros exones en el mismo pre-ARNm, corte y empalme en *cis*, y no con exones en otros pre-ARNm, corte y empalme en *trans*. Es posible, sin embargo, observar un corte y empalme en *trans* eficaz *in vitro* uniendo dos mitades de un pre-ARNm usando secuencias complementarias. Estas forman tallos de cadena doble estables mediante apareamiento de bases similar a "Watson-Crick". Konarska, M.M., R.A. Padgett y P.A. Sharp (1985), Cell 42, 165-171- Este tipo de corte y empalme en *trans* no se ha observado claramente *in vivo*.

El mecanismo de la aproximación al sitio de corte y empalme "a través del espacio" es independiente del intrón entre los sitios de corte y empalme, por ejemplo en el corte y empalme en *trans* observado comúnmente en tripanosomas y nematodos. Sutton, R.E. y J.C. Boothroyd, Cell, 47, 527-535 (1986); Murphy, W.J. *et al.*, Cell 47, 517-525 (1986); Krause, M. y D. Hirsch, Cell 49, 753-761 (1987). En estos casos muy especiales, el sitio de corte y empalme en 5' que contiene un ARN líder corto (SL) forma una partícula de ribonucleoproteína nuclear pequeña (RNPp) que interactúa con el extremo 3' del intrón en el pre-ARNm más grande (Bruzik, J.P. y J.A. Steitz, Cell, 62, 889-899 (1990); Bruzik, J.P. y T. Maniatis, Nature 360, 692-695 (1992). No se ha observado que este tipo de corte y empalme se produzca de manera natural en células de mamíferos.

Konarska *et al.* (1985), D. Solnik (1985) Cell 42, 157-164 detectaron corte y empalme en *trans in vitro* usando ARN que no se parecían a los ARN SL. Las estructuras secundarias ARN-ARN que se unían a los precursores aumentaron significativamente la eficacia de la reacción de corte y empalme en *trans* (desde <1% hasta el 15-30% de la eficacia de corte y empalme en *cis* de tipo natural).

Las secuencias de ADN o ARN complementarias pueden tener un apareamiento de bases específicamente con secuencias diana únicas de ARN o ADN. La especificidad de unión se ve influenciada por la secuencia, la longitud de la región complementaria y cualquier estructura secundaria en el sitio de unión. Con el fin de obtener especificidad de unión, se elige una secuencia única como diana. Se ha calculado que una longitud de cadena de 17 nucleótidos es suficiente para lograr especificidad de unión, es decir, la aparición única estadística de una diana de polinucleótido única en el genoma haploide humano de 3×10^9 pares de bases. M. Smith, Methods of DNA and RNA Sequencing, ed S.M. Weissman, Praeger, Nueva York, NY, EE.UU. pág. 39 (1983). La estabilidad del dúplex es independiente de la longitud para secuencias complementarias superiores a 200 nucleótidos [Steiner, R.F. y Beers, R.J. Jr. (1986)], en Polynucleotides, (Elsevier, Amsterdam). Secuencias complementarias mayores aumentan la estabilidad del dúplex, pero regiones muy largas pueden interactuar con ARNm múltiples mediante apareamiento de bases que implica sólo 5-10 bases contiguas, disminuyendo por tanto su especificidad. Las secuencias complementarias pueden tener secuencias de ADN o ARN que no se unen u otros análogos de ácidos nucleicos o grupos químicos en cualquiera de sus extremos en 5' y/o 3'. Puede lograrse también la unión por otros mecanismos, por ejemplo formación de hélice triple, e interacciones proteína-ácido nucleico, tales como aquellas entre promotores génicos y ADN. Los ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen el promotor de inmunoglobulina descrito por Brinster *et al.*, Nature, 306:332-336 (1983) y el promotor de insulina descrito por Buchini *et al.*, PNAS, 83:2511-2515 (1986). Pueden usarse otros medios de unión que se conocen por los expertos en la técnica.

Las toxinas tales como toxina de difteria (DT), ricina, toxina de Pseudomonas, toxina shiga y toxina de cólera son extremadamente potentes. Una única molécula de DT puede destruir una célula actuando enzimáticamente dentro del citosol. Yamaizumi, M. E. Makada, T. Uchida y Y. Okada, Cell 15, 245-250 (1978). Estas toxinas parecen tener una estructura básica similar, que consiste en una subunidad A y B, en la que la subunidad B se une a la superficie celular y facilita la translocación de la subunidad A dentro de la célula, y la subunidad A tiene actividad enzimática de la toxina. Collier, R. y J. Kondel, Biol. Chem. 246, 1496-1503 (1971) y Gill, D. y A. Pappenheimer, J. Biol. Chem. 246, 1492-1495 (1971). La subunidad A de DT (DT-A) cataliza la transferencia de ADP-ribosa desde el NAD hasta un aminoácido poco corriente (difamida) en el factor de elongación 2. Honjo, T., Y. Nishizuka y O. Hayaishi, J. Biol. Chem. 243, 3553-3555 (1969); y Gill, D., A. Pappenheimer, R. Brown y J. Kurniok, J. of Experimental Medicine 129, 1-21 (1969). Tal unión detiene la síntesis de proteínas en la célula y es mortal para esa célula. Existen varias estrategias terapéuticas que intentan administrar o expresar la DT-A dentro de células seleccionadas, incluyendo regular transcripcionalmente la expresión del gen de DT-A. (Robinson, D.F. T.H. Maxwell, Hum. Gene Ther., 6(2), 137-145, 1995; Cook D.R. *et al.*, Cancer Biother., 9(2), 131-141, 1994; Curiel, T.J. *et al.*, Hum Gene Ther., 4(6), 741-747, 1993).

Bruzik y Maniatis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7056-7059, julio de 1995, describen el corte y empalme en *trans* de fragmentos normalmente cortados y empalmados en *cis* de *Drosophila melanogaster* en extractos nucleares de células HeLa (de mamífero), usando la maquinaria de corte y empalme de estos núcleos de células.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico adecuada para usar en el corte y empalme en trans de un pre-ARNm diana expresado dentro de una célula diana y que puede reconocerse por componentes del corte y empalme nuclear dentro de la célula diana, comprendiendo el ácido nucleico:

a) uno o más dominios de unión a la diana que dirigen la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm diana;

b) (1) una región de corte y empalme en 3' que comprende un punto de ramificación, una extensión de pirimidina y un sitio de corte y empalme en 3'; o (2) un sitio de corte y empalme en 5';

c) una región espaciadora que separa la región de corte y empalme en 3' o el sitio de corte y empalme en 5', respectivamente, del dominio de unión a la diana; y

d) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans en el pre-ARNm diana.

La invención proporciona también molécula de ácido nucleico de este tipo para usarse en el reconocimiento por componentes de corte y empalme nucleares celulares para producir un ARN quimérico que sea terapéuticamente útil o sirva como un marcador.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención permite la expresión controlada de un producto génico heterólogo en una célula diana deseada creando un ARNm único por un mecanismo de corte y empalme en trans. El ARNm único tiene una de las siguientes funciones; codifica para una proteína que tiene un efecto terapéutico, destruye selectivamente células diana, sirve como un marcador o proporciona un producto génico novedoso no presente normalmente en la célula diana.

En una realización, el ARN, ADN o análogo de nucleótido que se usa para el corte y empalme en trans es uno cuyo producto de expresión después del corte y empalme en trans da como resultado la muerte celular (por ejemplo, la expresión de una molécula de subunidad A de la toxina de la difteria destruirá una célula humana). En otra realización, el producto de expresión se secreta por la célula. En una realización adicional, el propio ARN terapéutico realiza una función deseada en la célula.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A, 1B y 1C muestran la estructura de pre-moléculas terapéuticas (PTM, o pre-ARN-t) de la invención.

Estas estructuras tienen 5 características principales:

(a) *Región de dominio de unión a la diana*

Uno o dos dominios de unión de al menos 15 a 30 (hasta varios cientos) nucleótidos que son complementarios, y en orientación anti-sentido, a la región seleccionada como diana del pre-ARNm seleccionado (puede ubicarse una segunda región de unión a la diana en el extremo 3' de la molécula). Pueden incorporarse otros dominios de unión en la PTM. Los dominios de unión pueden potenciarse con características tales como la capacidad de cubrir o bloquear sitios requeridos para cortar y empalmar exones en sentido 3' en el ARNm diana, tales como la adenosina del punto de ramificación, sitios de unión empalmosómico, la extensión de polipirimidina, o sitios de corte y empalme.

(b) *Región de corte y empalme en 3' y/o sitio de corte y empalme en 5'*

La región de corte y empalme en 3' incluye un punto de ramificación, una extensión de pirimidina y un sitio de corte y empalme en 3'.

(c) *Región espaciadora*

Una región espaciadora para separar el sitio de corte y empalme del ARN terapéutico del dominio de unión a la diana. La región espaciadora puede tener características tales como codones de parada que bloquearán cualquier traducción de un ARN terapéutico que no ha experimentado corte y empalme, y secuencias que potencian el corte y empalme en la diana.

Puede incorporarse una "seguridad" para la pre-molécula terapéutica (PTM) en el espaciador, el dominio de unión, o en cualquier lugar en la PTM (figura 1-8). Ésta es una región de la PTM que cubre elementos del sitio de corte y empalme en 3' y/o 5' de la PTM por complementariedad relativamente débil, impidiendo el corte y empalme en trans no específico. Tras la hibridación de la(s) parte(s) de unión/selección como diana de la PTM, se deja al descubierto el sitio de corte y empalme en 3' y se vuelve completamente activo (véase la figura 1-C).

La “seguridad” consiste en uno o más tramos complementarios de secuencias en cis (o puede ser una segunda cadena de ácido nucleico separada) que se unen débilmente a uno o ambos lados del punto de ramificación de la PTM, la extensión de pirimidina, y/o el sitio de corte y empalme en 3’ (elementos de corte y empalme), o puede unirse a partes de los propios elementos de corte y empalme. Esta unión de “seguridad” impedirá que los elementos de corte y empalme se activen (es decir, bloqueo de la unión de U2 RNP u otros factores de corte y empalme con los elementos de reconocimiento del sitio de corte y empalme de la PTM). La unión de “seguridad” puede alterarse por la unión de la región de unión a la diana de la PTM con el pre-ARNm diana, exponiendo y activando así los elementos de corte y empalme de la PTM (haciéndolos disponibles para el corte y empalme en trans dentro del pre-ARNm diana).

(d) *Gen terapéutico*

Uno o más genes terapéuticos, tales como toxina de la difteria, que se corta(n) y empalma(n) dentro del ARNm diana y puede(n) expresarse posteriormente, produciendo un efecto terapéutico, tal como muerte celular (un gen terapéutico puede ser uno que facilita una función de utilidad clínica, por ejemplo, restaurar una función que falta, actuar como un marcador o destruir células no deseadas); y opcionalmente

(e) *Secuencias que modulan el corte y empalme y la traducción*

Puede haber características adicionales añadidas a la molécula después (o antes) del gen de la toxina, tales como señales de poliadenilación o secuencias de corte y empalme en 5’ para potenciar el corte y empalme, regiones de unión adicionales, regiones complementarias de auto-“seguridad”, sitios de corte y empalme adicionales, o grupos protectores para modular la estabilidad de la molécula (impedir la degradación).

La figura 2 muestra la unión del pre-ARN terapéutico y el corte y empalme en trans.

2a) El producto de corte y empalme en cis de pre-ARNm A-B para dar ARNm A-B, que es la ruta normal para la célula para expresar posteriormente la proteína A-B.

2b) Una molécula de pre-ARN-t unida a un pre-ARNm A-B mediante apareamiento de bases complementarias. En este ejemplo, la región de unión bloquea la adenosina del punto de ramificación en cis y la proyección en 5’ puede interferir parcialmente con la extensión de pirimidina en cis. Esto altera el corte y empalme en cis del exón B y presenta al gen de la toxina pre-ARN-t como un candidato para el corte y empalme en trans con el exón A.

2c) Un producto cortado y empalmado en trans de pre-ARNm A-B y un pre-ARN-t. El exón A está unido con un gen de toxina, que puede expresarse ahora en una molécula de ARN terapéutico heterólogo completamente funcional (ARNm-t). La traducción de este ARNm provocará la destrucción de la célula que lo expresa.

La figura 3 muestra el mapa y la secuencia de la toxina de la difteria. La región codificante para la subunidad A está entre los nucleótidos 312-890.

La figura 4 muestra la construcción de las pre-moléculas terapéuticas de la invención.

La figura 5 muestra el mapa y la secuencia de HCG beta.

Las figuras 6A y B muestran los resultados de la reacción de corte y empalme en trans. La figura 6A muestra un gel de agarosa de los productos de RT-PCR y la figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos del producto cortado y empalmado en trans.

La figura 7 muestra los resultados de los ensayos de toxicidad de la transfección del ejemplo 5.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere al uso del corte y empalme en trans de pre-ARN mensajero (pre-ARNm) seleccionado como diana como un medio para producir una molécula terapéutica en la célula. La molécula terapéutica puede proporcionar por sí misma una función deseada, o puede producir un producto génico en el tipo de célula específico. Los productos génicos pueden ser de cualquier gen, incluyendo genes que tienen utilidad clínica, por ejemplo, genes terapéuticos o marcadores, y toxinas. En una realización de la invención, el gen se administra como un gen de toxina, por lo cual la expresión de una molécula es mortal para la célula que contiene el pre-ARNm seleccionado como diana.

En una realización, la invención se refiere a un método de creación de un ARNm específico para provocar la expresión de un gen de toxina terapéutica dentro de la población celular seleccionada, destruyendo de ese modo las células específicas. Las células diana pueden incluir, pero no se limitan a, aquellas infectadas con agentes infecciosos virales o de otro tipo, neoplasmas benignos o malignos, o componentes del sistema inmunitario que están implicados en enfermedad autoinmunitaria o rechazo de tejidos. Se logra la especificidad mediante modificación del dominio de unión de la PTM para unirse a la diana.

Las etapas que comprende una realización del método de la presente invención son:

- i) administrar al núcleo de células una molécula precursora, que puede ser de cualquier forma usada por un experto en la técnica, una molécula de ARN terapéutica (o un vector de ADN que puede transcribirse para dar ARN o un análogo sintético), ARN terapéutico precursor (pre-ARN-) que contiene una región de unión que puede unirse por mecanismos diferentes al pre-ARNm diana, un sitio de corte y empalme, un gen terapéutico, y puede contener señales de poliadenilación, potenciadores, u otros elementos de secuencia moduladores [véase la figura 1, parte A, B, y C];
 - ii) corte y empalme en trans de la molécula de ARN terapéutica precursora con un pre-ARNm seleccionado como diana para crear un ARNm traducible terapéutico [véase la figura 2b]; y
 - iii) expresión (traducción) del ARNm terapéutico cortado y empalmado en trans dentro de la(s) célula(s) diana [véase la figura 2c].
- Las células diana pueden ser cualquier célula que se sabe que expresan una población única de pre-ARNm, pre-ARNm que pueden usarse como sustrato para la reacción de corte y empalme en trans. La población única puede ser un único tipo de ARN o varios que, como un grupo, no se expresan juntos en cualquier otro tipo de células. El ARN terapéutico precursor contendrá regiones de unión específicas para el pre-ARNm seleccionado como diana.
- La pre-molécula terapéutica puede administrarse a células mediante cualquier procedimiento de administración, por ejemplo, mediado por virus, electroporación, microinyección, transfección mediada por fosfato de calcio, liposomas, citofectinas, o directamente. La pre-molécula terapéutica se administrará en cantidades que son eficaces para producir la cantidad deseada de la propia molécula terapéutica. La cantidad exacta administrada variará dependiendo de los detalles del sistema de administración. La cantidad eficaz puede variar también dependiendo de si la molécula terapéutica proporciona una función que falta (tal como en tratamientos para una enfermedad genética), muerte celular (tal como en tratamiento para el cáncer), o regulación celular (que puede usarse con diferentes tipos de enfermedades). La cantidad eficaz puede oscilar desde 0,001 pico g, o incluso inferior, hasta 1,0 g de ácido nucleico/kg de peso corporal del paciente.
- Una molécula terapéutica puede ser una que proporciona alguna función de utilidad clínica, por ejemplo, restaurar una función que falta, actuar como un marcador, o destruir células no deseadas.

En una realización, la molécula de pre-ARN terapéutico es un ARN de cadena sencilla no traducible con cuatro características principales: 1) Uno o dos dominios de unión de al menos 15 a 30 nucleótidos (y hasta varios cientos de nucleótidos o más) que son complementarios y en orientación anti-sentido a la región seleccionada como diana del pre-ARNm único. Esto confiere la especificidad de la unión y ancla el pre-ARN terapéutico estrechamente en el espacio de forma que la maquinaria de procesamiento empalmosómico del núcleo puede cortarlo y empalmarlo en trans para dar el pre-ARNm diana. Los dominios de unión pueden potenciarse con características tales como la capacidad de cubrir o bloquear sitios requeridos para cortar y empalmar en cis exones en sentido 3' en el pre-ARNm diana, tal como la adenosina del punto de ramificación, sitios de unión empalmosómicos, extensiones de polipirimidina, o sitios de corte y empalme en 3' y 5' auténticos. 2) Una región espaciadora para alinear el sitio de corte y empalme del pre-ARN terapéutico con la diana. La región espaciadora puede tener características tales como codones de parada que bloquearán cualquier traducción de un pre-ARN terapéutico que no ha experimentado corte y empalme, y secuencias que potencian el corte y empalme con la diana. El espaciador sirve también para separar dominios de unión del sitio de corte y empalme (y puede contener un dominio de "seguridad") 3) Un sitio de corte y empalme en 3'. 4) Uno o más genes terapéuticos, tales como toxina de la difteria, que se corta(n) y empalma(n) dentro del ARNm diana y se expresan posteriormente, produciendo un efecto terapéutico, tal como muerte celular, que es deseable cuando se trata un tumor maligno. Puede haber características adicionales añadidas según se necesite para la molécula después del gen de la toxina (marco de lectura abierta), tales como señales de poliadenilación o secuencias de corte y empalme en 5' para potenciar el corte y empalme y las etapas que conducen a la traducción y expresión. En la realización de la invención en la que el propio ARN cortado y empalmado es la molécula terapéutica, puede no haber gen terapéutico, sino en su lugar ARN con los efectos deseados. El corte y empalme en trans puede mediar por cualquier mecanismo conocido (Grupo I, Grupo II, o empalmosoma).

La presente invención tiene enorme aplicación clínica en el tratamiento de cáncer, VIH/SIDA y otras infecciones víricas graves, trastornos autoinmunitarios, y otros estados patológicos en los que la alteración o eliminación de un tipo de células específico sería beneficioso. Los ejemplos de esto incluyen hipertrofia de próstata benigna y otros estados pre-malignos. Adicionalmente, puede usarse también para tratar trastornos genéticos heredados, tales como enfermedad de Gaucher, en la que la expresión de una pequeña cantidad del producto génico que falta o mutante produce un fenotipo normal.

En otra realización, la PTM es un ARN de cadena sencilla no traducible con las características enumeradas anteriormente: 1) Uno o dos dominios de unión; 2) Región espaciadora; 3) Un sitio de corte y empalme en 5', y 4) Uno o más genes terapéuticos, y puede haber secuencias adicionales que confieren características adicionales (tal como se mencionó en los otros ejemplos). El corte y empalme en trans en esta invención está mediado por el empalmosoma, al contrario que el que usa ribozimas de intrones grupo I tal como en los documentos WO 92/18089 y 92/18090.

Maximizar el corte y empalme en trans

1. Los pre-ARN-t se construyen para complementar y unirse en 5' y 3' respecto el BPA, y pueden incluir o no la adenosina del punto de ramificación (bloquearlo). Esto permite la localización de dominios de unión anti-sentido óptimos.
2. Las PTM se preparan con y sin la adenosina del punto de ramificación en el pre-ARN-t para determinar si la inclusión del BPA conduce a corte y empalme no selectivo (dentro de ARNm no seleccionados como diana).
3. Las PTM se preparan con y sin codones de parada u otros elementos en la región entre el dominio de unión y el sitio de corte y empalme, para determinar si tales elementos impiden totalmente la expresión de pre-ARN-t que no ha experimentado corte y empalme.
4. Las PTM se preparan con y sin señal de poliadenilación fuerte o potenciador en sentido 3' o secuencias de corte y empalme en 5' en sentido 3' del gen de la toxina, para determinar si estos elementos promueven el corte y empalme en trans.
5. Las PTM se preparan con y sin un segundo dominio de unión anti-sentido en sentido 3' del gen de la toxina para determinar si tal elemento promueve la unión al exón diana en 3' y promueve la extensión para bloquear el sitio de corte y empalme en 3' en cis auténtico (sitios de unión U5 y/o U1). Las PTM también pueden prepararse para que requieran un segundo corte y empalme en trans para la expresión del producto cortado y empalmado en trans.
6. Se incorporan en los constructos elementos adicionales tales como una estructura en horquilla en 3', ARN circularizado, modificación de bases de nucleótidos, o análogos sintéticos para promover o facilitar la localización nuclear y la incorporación empalmosómica, y la estabilidad intracelular.
7. El constructo terapéutico final puede tener que administrarse desde la membrana celular externa y transitar dentro del núcleo para incorporarse dentro del empalmosoma del pre-ARNm seleccionado como diana, o puede producirse por la propia célula a partir de una molécula precursora (vector de ADN, virus de ARN, etc.).

Sistemas de administración

La presente invención puede usar cualquier sistema de administración conocido desarrollado para otro tratamiento génico o métodos anti-sentido. El pre-ARN terapéutico debe prepararse, empaquetarse y someterse a prueba para la incorporación celular. La síntesis química del pre-ARN-t de longitud completa no es práctica actualmente, ya que la síntesis química se limita a aproximadamente 100 nucleótidos, pero podría ser posible. El pre-ARN-t de longitud completa se transcribe a partir de moldes amplificados por PCR (usando enzimas de fidelidad alta) o ADN clonado con un promotor apropiado incorporado. Existen también métodos de amplificación de ARN tales como amplificación Q-β que pueden utilizarse. El ARN-t cortado y empalmado se purifica y se somete a prueba mediante secuenciación o mediante la capacidad de cortar y empalmar en trans la diana y producir la toxina o el marcador en un sistema *in vitro*.

Los liposomas, electroporación, y citofecciones son métodos para introducir directamente ARN dentro de células. Se usan ampliamente en protocolos de administración de ARN anti-sentido. Otro posible medio de administración es ADN desnudo o empaquetado. Pueden usarse también sistemas de administración víricos; aunque son más caros para cultivar y manipular, y pueden no aceptarse fácilmente por el público. Los vectores víricos con expresión transitoria, tales como adenovirus y virus adeno-asociados, que no se integran dentro del genoma, pueden ser menos problemáticos. Pueden administrarse también polímeros de ácidos nucleicos uniéndolos a cápsulas vacías de virus incompetentes para la replicación. Cook, D.R. *et al.* Cancer Biother. 9(2), 131-141 (1994).

Ejemplo 1

Selección del gen terapéutico

Un gen terapéutico es cualquier gen que proporcione alguna función novedosa que incluye utilidad clínica, por ejemplo, restaurar una función que falta, actuar como un marcador, o destruir células no deseadas. Los genes para restaurar funciones que faltan pueden ser genes que codifican para productos génicos que faltan o se alteran en enfermedades genéticas conocidas. Los genes marcadores pueden ser genes que provocan la expresión de proteínas o péptidos heterólogos específicos que pueden usarse para identificar u obtener imágenes de células. Los genes para destruir células pueden ser toxinas sencillas u otros genes que proporcionan alguna función que potencia la susceptibilidad de las células a tratamientos posteriores, tales como radiación o quimioterapia.

La toxina de la difteria es un buen ejemplo de una toxina sencilla. La DT nativa está compuesta por una subunidad A y una subunidad B. La subunidad A de la toxina de la difteria contiene la actividad enzimática de la toxina y funcionará si se expresa o administra dentro de células humanas. La subunidad B se requiere para el movimiento transmembrana dentro de células humanas. La subunidad A no puede entrar en células intactas por sí misma. Sola, la subunidad A tiene toxicidad muy baja porque no puede cruzar la bicapa lipídica de una membrana celular sin la subunidad B. Donovan, J. M. Simon y M. Montal, J. Biol. Chem 260, 8817-8823 (1985). La subunidad A puede existir en varias conformaciones. El gen para la subunidad A de la toxina de la difteria tiene justo por debajo de 600 nt de longitud.

Greenfield, L., M. Bjorn, G. Horn, D. Fong, G. Buck, R. Collier y D. Kaplan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 6853-6857 (1983). Véase la figura 3. El péptido DT-A puede ser activo con secuencias peptídicas heterólogas unidas. Leckett, B. y R. J. Germinario, Cytotechnology 10(2), 125-136 (1992). Como una medida de seguridad adicional, puede ser posible la inmunización contra DT-A liberada en el entorno extracelular. Barbieri, J.T., D. Armellini, J. Molkentin, y R. Rappuoli, Infect. Immun. 60(12) 5071-5077 (1992). Existen otras varias toxinas conocidas que pueden usarse en la presente invención.

Ejemplo 2

10 Construcción de pre-moléculas terapéuticas

Se usa un sistema de modelo *in vitro* para determinar los parámetros de la pre-molécula terapéutica y ARNm diana para el corte y empalme en trans más eficiente.

15 1. Demostración del corte y empalme en trans: se añaden moléculas de pre-ARN-t experimentales (PTM) (véase la figura 4 y la leyenda) que contienen dominios de unión anti-sentido complementarios a un pre-ARN (que abarca la adenosina del punto de ramificación (BPA) de la diana; bloqueando de ese modo el corte y empalme del exón en sentido 3' en cis), diversas regiones espaciadoras que contienen un BPA expuesto, un sitio de corte y empalme en 3' y un gen marcador (subunidad A de la toxina de la difteria (DTA)) a un sistema *in vitro* que contiene todos los componentes de corte y empalme nucleares y un pre-ARNm seleccionado como diana (HCG beta). Véase la figura 5. El corte y empalme en trans se demuestra mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) usando un cebador complementario al exón 1 en 5' de HCG beta y un segundo cebador (inverso) complementario al gen marcador (DTA). Se secuenciaron los productos de PCR para demostrar el producto de corte y empalme en trans correcto del exón en 5' en sentido 5' y el gen marcador.

25 La figura 6A muestra que PTM + espaciador (PTM 2) produjo sustancialmente más producto de ACG/DTA cortado y empalmado en trans en 60 min que PTM 1 (PTM +) o PTM 4 (TB + espaciador) y cinco veces más de HCG/DTA cortado y empalmado en trans que PTM1 o PTM4 después de una reacción de 90 min en una reacción de corte y empalme de extracto nuclear HeLa. PTM1 y PTM4 produjeron cantidades aproximadamente equivalentes de producto cortado y empalmado en trans después de 90 minutos de incubación. Este experimento demuestra que una región de unión de 18 nt puede potenciar significativamente la especificidad del corte y empalme en trans, cuando se usa junto con una región espaciadora entre el dominio de unión y el sitio de ramificación. La carencia de corte y empalme en trans potenciado de PTM 1 por encima de PTM 3 (datos no mostrados) o PTM4 se debe a la proximidad del dominio de unión al punto de ramificación en PTM 1, en la que la unión al gen diana bloquea el acceso de factores de corte y empalme al punto de ramificación adyacente, ya que sólo hay 6 nt separando los sitios. La pequeña cantidad de corte y empalme en trans no seleccionado como diana observado entre pre-ARNm de HCG beta y PTM3 o PTM4 no era inesperada, ya que los constructos de PTM 1-4 se produjeron usando el sitio de ramificación consenso de levaduras (UACUAAC), que tiene mayor actividad que el consenso de mamíferos relativamente más débil, YNYURAC (en el que A es el sitio de formación de la ramificación, Y = pirimidina, N = cualquier nucleótido, y R = purina). Adicionalmente, los constructos de PTM 1-4 contienen una extensión de pirimidina muy fuerte. Juntos, esta combinación de sitio de ramificación-extensión de pirimidina da como resultado PTM con una alta tendencia a unirse a factores de corte y empalme, tales como U2 AF y U2 RNPnp, y a cortarse y empalmarse de manera muy eficaz. Además, las concentraciones de pre-moléculas terapéuticas y pre-ARNm de HCG beta diana son *supra*-fisiológicas en este experimento, lo que potencia la probabilidad de corte y empalme en trans no seleccionado como diana (unido).

45 PTM 5 y PTM 6 se han diseñado para eliminar la extensión de pirimidina y el sitio de corte y empalme en 3' para mostrar que la unión de un PTM con el exón 1 de HCG beta se debe a corte y empalme en trans. Se produjo PTM 7 para eliminar sólo el sitio de corte y empalme de AG en 3'. Patterson B y Guthrie C., Cell 64: 181-7 (1991). Están sometándose a prueba PTM 5-7 en experimentos de cultivo de tejidos transfectados, ya que la especificidad dentro de células intactas es más relevante para la aplicación terapéutica.

55 El intrón modelo experimental se clona en una sección de la unidad de corte y empalme Líder 1 y Líder 2 del promotor tardío principal del adenovirus 2, que contiene un sitio de corte y empalme en 5', un punto de ramificación, una extensión de pirimidina, y un sitio de corte y empalme en 3'. Esta secuencia se clona en un vector de expresión, tal como pcDNA3,1 (Invitrogen Corp.), con un promotor de ARN T7 en sentido 5', de forma que el ARN de la unidad de corte y empalme pueda transcribirse usando la ARN polimerasa T7 (Stratagene). La secuencia de nucleótidos (ADN) de tal inserto es:

pcDNAII-T7 promotor 5'-

5 **GGGCGAATTCGAGCTCACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGA**

10 **GGTACCTGTTGGG/GTGAGTAGGATCCCTCTAAAAGCGGGCA**

15 **↑**

20 **TGACTTCTAGAGTAGTCCAGGGTTTCCGAGGGTTTCCGTCGA**

25 **CGATGTCATACTTATCCTGGGCCCTTTTTCCTCCACAG/CTC**

30 **↑ # ↑**
BPA **

35 **GCGCTGCAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTGCATGCAAGCTT**

Secuencia marcadora 3'

Clave:

* = sitio de corte y empalme en 5'; CATACT.. = región diana para la unión; BPA = adenosina del punto de ramificación; # = extensión de Py; ** = sitio de corte y empalme en 3'.

El extremo 3' del intrón modelo contiene una secuencia marcadora, tal como el promotor Sp6 o marcadores de selección peptídicos expresables, de forma que un producto cortado y empalmado correctamente es detectable por separación electroforética como una secuencia de ARNm más corta que un transcrito T7 que no ha sufrido corte y empalme. El producto cortado y empalmado es detectable también por amplificación por PCR usando cebadores de las secuencias T7 y Sp6 (o un cebador apropiado para el marcador usado).

Se varían y prueban varias regiones de las moléculas de pre-ARN terapéuticas para la capacidad de cortarse y empalmarse en trans específicamente y determinar la frecuencia del corte y empalme en trans.

a) Dominio de unión - selección como diana de la extensión de pirimidina y el punto de ramificación:

CATACTTATCCTGGGCCCTTTT = Secuencia DIANA del promotor tardío principal del adenovirus 2 en orientación 5' a 3'.

3' - TTTTCCCGGGTCCTATTCATAC - 5' Secuencia DIANA en orientación inversa

Molécula de pre-ARN-t modelo

5 **AAAAGGGCCCAGGATAAGTATGCACGGCGACTATTGATTCT**
 ++++++

10 **GAGAACTGTGTTATACTAACGGAACCTCCCTTTTTTTTCCACAG/**
 ++++++ ↑ # **

15 **BPA**
AGCCAGCCAGAACTCGCCCCGAAGACCCGAGGATGTCGAG

20

25 **CACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCG**
 ↑
 !

30 **AAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACGCTGAGCAATAACTAGC**

35 **ATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG-3'**

40 Clave:

AAAAGG.. = región diana para la unión; ++++ = región espaciadora; BPA = adenosina del punto de ramificación; # = extensión de Py; ** = sitio de corte y empalme 3'; ACCCAG... = marcador de proteína HSV; CACCAC... = marcador de proteína histidina; ! = codón de parada.

45 La inclusión de un marcador de proteína histidina permitirá la detección usando la cromatografía de quelación metálica y el marcador de proteína HSV permitirá la detección usando anticuerpos monoclonales. Estos reactivos están disponibles de Novagen, Inc.

50 b) Se preparan moléculas de pre-ARN terapéutico modelo adicionales que son similares a las anteriores, con diferentes regiones de unión complementarias, desplazadas para hibridar o bien más 5' o bien 3' en la molécula diana para establecer la región óptima para seleccionar como diana/bloquear y para potenciar la reacción de corte y empalme en trans. Se añaden otros elementos de secuencia que modulan el corte y empalme para potenciar o disminuir la eficacia de corte y empalme en trans.

55 Ejemplo 3

Reacción de corte y empalme in vitro

60 Estas secuencias de ADN se clonaron en plásmidos de expresión y huéspedes. Las secuencias se verificaron por secuenciación de ADN dideoxi de Sanger. Los ARN se preparan a partir de ADN de plásmido o moldes amplificados por PCR y se transcriben usando la polimerasa de ARN T7. O bien la diana, o bien el pre-ARN-t pueden sintetizarse en presencia de $\alpha^{32}\text{P}$ UTP. Los pre-ARNm de longitud completa y las dianas se purifican por electroforesis en gel. Jamison, S.F., A. Crow, y M.A. García-Blanco, Mol. Cell Biol. 12, 4279-4287 (1992).

65 Los extractos nucleares preparados usando el procedimiento de Dignam, J.D. *et al.*, (Nucl. Acids Res., 11, 1475-1489, 1983) se adquirieron de Promega. Se realizaron los ensayos de corte y empalme *in vitro* como en el documento de García-Blanco, M.A., S.F. Jamison, P.A. Sharp, (Genes and Dev., 3, 1874-1886, 1989). Las reacciones de corte y

empalme se incuban durante diversos tiempos. Tras la finalización, los productos de reacción se separan por electroforesis sobre geles de poliacrilamida. Los complejos de corte y empalme se someten a electroforesis sobre geles de arcilamida no desnaturalizantes y se visualizan por autorradiografía. Los productos de corte y empalme *in vitro* se analizan sobre geles de arcilamida desnaturalizantes. Jamison *et al.*, Mol. Cell Biol. 22, 4279-4287 (1992).

Se analizaron los productos cortados y empalmados por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) en reacciones separadas usando cebadores específicos o bien para el producto cortado y empalmado en *cis* nativo, o bien para el producto cortado y empalmado en *trans* híbrido, con el cebador 5' complementario al exón 5' del ARNm diana, y el cebador 3' complementario al marcador cortado y empalmado en *trans* o gen terapéutico. Se usó el mismo cebador 5' para detectar el producto cortado y empalmado en *cis* y *trans*. Hay un aumento de corte y empalme en *trans* conferido por la especificidad del dominio de unión. (Véase el gel, Figura 6A).

También pueden expresarse Los productos cortados y empalmados en un sistema de traducción libre de célula, siendo el producto cortado y empalmado en *trans* detectable mediante ensayo de inmunotransferencia tipo Western y secuenciación de proteínas, bajo ciertas condiciones, es decir, si la tasa de corte y empalme en *trans* es suficientemente alta para producir concentración suficiente de proteína marcadora para la detección.

Ejemplo 4

Reacción de corte y empalme in vitro competitiva

Este ejemplo es idéntico al ejemplo 3, excepto que contiene una mezcla de moléculas de pre-ARNm, con sólo una cantidad limitada de pre-ARNm seleccionado como diana. Esto permite la demostración de la reacción de corte y empalme en *trans* en presencia de una reacción de corte y empalme en *cis* presumiblemente preferida. Se usa la RT-PCR para determinar la especificidad del corte y empalme en *trans* entre el pre-ARNm diana y el pre-ARN-t en presencia de pre-ARNm competidores no seleccionados como dianas. Se realizan amplificaciones por RT-PCR adicionales usando un cebador para la secuencia marcadora y cebadores específicos para los pre-ARNm no seleccionados como dianas para detectar posibles acontecimientos de corte y empalme en *trans* aleatorios.

Ejemplo 5

Reacción de corte y empalme en trans en células cultivadas de cáncer de pulmón humano

Se usó un modelo de cultivo celular de un cáncer de pulmón humano para demostrar que se logra la eliminación terapéutica (destrucción) de células diana que expresan un gen único (pre-ARNm) usando las moléculas de toxinas pre-terapéuticas de la invención. Véase la Figura 7. Se usan experimentos de células mixtas para mostrar que sólo se eliminan las células diana. Se modificaron adecuadamente los constructos de pre-ARN-t satisfactorios identificadas durante experimentos *in vitro* se modificaron para su uso en los experimentos de cultivo celular. Los experimentos están actualmente en proceso para mejorar la especificidad de la destrucción celular, tal como para la adición de una "seguridad".

Los estudios preliminares sugieren que la primera generación de PTM pueden tener una tasa alta de corte y empalme en *trans* no seleccionado como diana (promiscuo). Esto no fue un resultado inesperado, ya que se diseñaron los PTM de primera generación para maximizar la eficiencia de corte y empalme. Se están probando varias modificaciones para mejorar la especificidad. Éstas incluyen:

1. Adición de una "seguridad" para cubrir alguno o todos los elementos de corte y empalme del PTM.

2. Cambiar las secuencias del punto de ramificación y la extensión de pirimidina de modo que sean elementos de corte y empalme menos eficientes.

3. Alterar el extremo 3' del PTM, de forma que no contenga ninguna señal de poliadenilación, pero pueda experimentar una segunda reacción de corte y empalme en *trans*, actuando como el sitio de corte y empalme donador 5' para el sitio de corte y empalme 3' del exón Terminal de un HCG beta, adquiriendo de ese modo la señal de poliadenilación necesitada para exportar al citoplasma y traducir la proteína química terapéutica.

4. Clonar el PTM en un vector de expresión inducible, donde la cantidad de PTM transcrito puede regularse (quizás el corte y empalme en *trans* es un acontecimiento común).

Ejemplo 6

Reacción de corte y empalme en trans en líneas celulares de carcinoma de cuello uterino humano

Se optimizan los constructos para estabilidad y capacidad de unirse a un sitio específico y garantizar que la molécula pre-terapéutica pueda producirse en, transportarse y/o enviarse a un sitio celular donde se desee el corte y empalme. Se hicieron estudios preliminares usando plásmidos de expresión eucariotas, que producen el constructo de pre-ARN-t dentro del núcleo, así que la unión específica, corte y empalme seleccionado como diana y estabilidad son los objetivos de diseño para las moléculas pre-terapéuticas iniciales. Puede usarse un vector que contiene un promotor

inducible por conveniencia o para regular la concentración de PTM en la célula. Se consigue la inducción del ARN pre-terapéutico mediante la introducción en el medio de un producto químico no tóxico sencillo. Por ejemplo, IPTG induce la transcripción del inserto en pOP13 CAT (Stratagene). También puede incorporarse un segundo marcador seleccionable adicional, tal como resistencia a neomicina; con tal marcador, sólo las células que han captado el vector sobrevivirán bajo condiciones de crecimiento selectivo.

Otros modelos de enfermedad posibles con dianas génicas únicas incluyen: una línea celular de carcinoma de cuello uterino humano que expresa la proteína E6 o E7 del virus del papiloma, una línea celular de cáncer de próstata que expresa antígeno específico de la próstata, una línea celular de carcinoma hepático humano que expresa la proteína CEA, u otras líneas que expresan un producto génico específico de tejido (páncreas, hígado, pecho, colon, melanoma) o que producen una proteína asociada a un cáncer, tal como HCG (gonadotropina coriónica humana), leucemia con producto génico de fusión bcrabl t(9a34;22q11), u otros genes de fusión de translocaciones cromosómicas.

Después puede probarse un sistema modelo de virus de papiloma. El tratamiento de displasia y cáncer de cuello uterino son problemas clínicos principales. Este modelo ofrece la capacidad de demostrar la efectividad tanto contra un cáncer como una infección vírica. Las mujeres infectadas con los serotipos 16 ó 18 del virus de papiloma que expresa los genes E6 y E7 están en riesgo alto de desarrollar cánceres de cuello uterino.

El trabajo inicial se hace sobre una línea celular que se transfecta con un plásmido de expresión seleccionable (tal como por la capacidad de crecer en presencia de un antibiótico normalmente tóxico, tal como resistencia a higromicina conferida por el plásmido pREP4 (disponible a partir de Stratagene) dentro del que se clona una región contigua de un virus de papiloma tipo 18 que contiene E6 y E7 y una región de corte y empalme que contiene un sitio de corte y empalme en 5', un BP, una extensión de pirimidina y un sitio de corte y empalme en 3' respecto a la diana (plásmido 1).

Demostración del corte y empalme in trans: La línea celular anterior se transfecta con un segundo plásmido de expresión (plásmido 2), con un marcador seleccionable diferente, tal como resistencia a G418 (neomicina) proporcionada por pcDNA I Neo (Stratagene), y un casete de expresión que codifica para un pre-ARN terapéutico formado por el plásmido 1 de expresión. Como antes, la molécula de pre-ARN-t presenta un dominio de unión anti-sentido que puede bloquear la BPA del pre-ARNm diana, una región espaciadora, un punto de ramificación, una extensión de pirimidina, un sitio de corte y empalme en 3' y un gen marcador o de toxina y secuencias que modulan el corte y empalme. En el caso de que el gen cortado y empalmado in trans sea un gen de toxina, no se esperaría que estas células sobreviviesen durante mucho tiempo. El corte y empalme in trans se demuestra por la expresión de una proteína marcadora (en el caso de un gen marcador) o una toxina. La toxina puede detectarse con un anticuerpo, o puede detectarse la presencia del ARNm híbrido por RT-PCR.

Se ensayaron las células transfectadas con ensayos de inhibición del crecimiento según el método de El-Deiry, *et al* (Cell 75, 817-825, 1993). Se transfectaron las células con un plásmido de expresión. Se seleccionaron las colonias basándose en el crecimiento en presencia de G418. Las células se expandieron, se dividieron en tres grupos, y se transfectaron con plásmidos que contenían: a) un pre-ARN-t de unión a la diana con un gen de toxina auténtico (PTM 2), b) un pre-ARN-t con un gen de toxina orientado anti-sentido o mutado (PTM8), c) sin inserto (control de vector pc3.1) o d) una PTM que no se une a la diana (no homóloga), PTM4. Se mide la inhibición del crecimiento como una reducción en el número de colonias resistentes a antibiótico generadas. Los vectores basados en CMV (citomegalovirus) permiten niveles altos de expresión constitutiva del gen transfectado en células diana. Los resultados se muestran en la Figura 7. Puede realizarse un experimento inverso comenzando con células transfectadas con el plásmido 2 primero y plásmidos diana intactos o mutados (plásmido 1).

Breve descripción de un experimento de transfección doble: Se colocan las células en placas petri y se transfectan con una cantidad fija de plásmido 1 (diana con resistencia a higromicina), normalmente 2 µg de ADN, y con plásmido 2 (que contiene pre-ARN-t y resistencia a G418) a diversas concentraciones. Selección por resistencia de colonias por incubación en G418 y/o higromicina durante 2-3 semanas. Las colonias se teñirán con azul de metileno y se contarán.

Resultados del ensayo - Teóricos

1. Control (sin transfección) - Sin colonias
2. Control (2 µg de plásmido 1) - 200-500 colonias
3. Control (2 µg de plásmido 2 sin gen de toxina [eliminado o mutado], y 2 µg de plásmido 1) - 200500 colonias
4. 2 µg de plásmido 1 y 2 µg de plásmido 2 - 20-50 colonias
5. 2 µg de plásmido 1 y 20 µg de plásmido 2 - 2-5 colonias.

Conclusión: El plásmido 2, que contiene el gen de la toxina funcional en la molécula de pre-ARN-t, inhibe el crecimiento de estas células.

ES 2 279 531 T3

Breve descripción de un experimento de transfección alternativo: Las células se colocan en placas petri y se transfectan con una cantidad fija de plásmido 2 (que contiene pre-ARN-t y resistencia a G418) a diversas concentraciones. Selección por resistencia de colonias por incubación en G418 y/o higromicina durante 2-3 semanas. Las colonias se teñirán con azul de metileno y se contarán.

Resultados del ensayo - Teóricos

1. Control (sin transfección) - Sin colonias

2. Control (4 μ g de plásmido 1) - 200-500 colonias

3. Control (4 μ g de plásmido 2 sin gen de toxina [eliminado o mutado], y 4 μ g de plásmido 1) - 200-500 colonias

4. 4 μ g de plásmido 1 y 4 μ g de plásmido 2 - 20-50 colonias

5. 4 μ g de plásmido 1 y 20 μ g de plásmido 2 - 2-5 colonias.

Conclusión: El plásmido 2, que contiene el gen de la toxina funcional en la molécula de pre-ARN-t, inhibe el crecimiento de estas células.

Se realizan controles experimentales para demostrar que la inhibición del crecimiento celular es debida a la expresión de la toxina y no debida a la producción de una citoquina, tal como interferón, que se esperaría que ocurriese cuando está presente dentro de las células ARN de doble cadena. En estos experimentos, se cambia el dominio de unión de forma que no se una más, o se muta el gen de toxina de forma que no es expresable por inserción de una mutación puntual sin sentido de desplazamiento de marco, o inserción del gen de toxina en una orientación anti-sentido, pero el resto del constructo estará inalterada. Las células transfectadas con el plásmido 1 y el plásmido 2 sin dominio de unión o un gen de toxina no expresable deben crecer así como las células que no contienen constructo de pre-ARN-t.

Se hacen experimentos con células mixtas. Éstos incluyen estudios en los que las células que carecen de plásmido 1 se transfectan con el plásmido 2 junto con células que contienen el plásmido 1. La población final debe ser capaz de crecer bien en presencia de G418 (la resistencia conferida por el plásmido 2), pero no deben crecer en presencia del agente 1 selectivo (las células que contienen ambos plásmidos deben eliminarse por la toxina cortada y empalmada en trans). Pueden hacerse cultivos mixtos adicionales para demostrar que la expresión de toxina dentro de células adyacentes no afecta a la supervivencia de células no seleccionadas como diana.

Ejemplo 7

Experimentos en animales

1ª Fase

Ratones

Se administraron a ratones células transformadas con plásmidos de pre-ARN-t inducibles. Estas células se desarrollarán en el modelo de cultivo celular descrito anteriormente, y se obtienen por lo tanto animales enfermos con un promotor inducible en frente del constructo que se puede cortar y empalmar en trans. Después se induce el vector y se destruyen las células de la enfermedad mediante la expresión de la toxina y el animal debe mantenerse sano. Este último punto es importante para mostrar que la inducción del gen de toxina no tiene un efecto adverso generalizado. También se examinan algunas de las células de la enfermedad poco después de la inducción para buscar con anticuerpos pruebas de la expresión del gen de toxina y también para realizar PCR de transcripción inversa para demostrar que ocurre corte y empalme en trans. Se realiza un seguimiento de los animales para supervivencia a largo plazo y posible toxicidad. Pueden usarse ratones atímicos para cultivar células humanas.

Como alternativa las PTM pueden administrarse por electroporación o liposomas.

2ª Fase

Demostración del concepto terapéutico

En esta fase se usan animales con células de enfermedad no transformadas (preferiblemente células humanas en ratones atímicos). Pueden usarse células pancreáticas humanas o de cáncer de pulmón que expresen HCG beta con las PTM desarrolladas para los experimentos previamente enumerados. Pueden usarse células de cáncer de cuello uterino humano que contienen la región diana del virus de papiloma tipo 18 usada en el modelo celular anterior. Se inyecta o introduce por electroporación la forma administrable de la construcción de ARN pre-terapéutico a ratones atímicos con tumores de cáncer pancreático humano o cáncer de cuello uterino. Los animales de control reciben pre-ARN-t con genes de toxina incompetentes para la expresión o pre-ARN-t falso (que no se une a la diana). Se examinaron los animales como anteriormente para supervivencia a largo plazo y toxicidad.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico adecuada para usar en el corte y empalme en trans de un pre-ARNm diana expresado dentro de una célula diana y que puede reconocerse por componentes de corte y empalme nucleares dentro de la célula diana, comprendiendo el ácido nucleico:
 - a) uno o más dominios de unión a la diana que dirigen la unión de la molécula de ácido nucleico con el pre-ARNm diana;
 - b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, una extensión de pirimidina y un sitio de corte y empalme 3';
 - c) una región espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a la diana; y
 - d) una secuencia de nucleótidos para cortar y empalmar en trans con el pre-ARNm diana.
2. Una molécula de ácido nucleico adecuada para usar en el corte y empalme en trans de un pre-ARNm diana expresado dentro de una célula diana y que puede reconocerse por componentes de corte y empalme nucleares dentro de la célula diana, comprendiendo el ácido nucleico:
 - a) uno o más dominios de unión a la diana que dirigen la unión de la molécula de ácido nucleico con el pre-ARNm diana;
 - b) un sitio de corte y empalme 5';
 - c) una región espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a la diana; y
 - d) una secuencia de nucleótidos para cortar y empalmar en trans con el pre-ARNm diana.
3. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, que comprende además un sitio de corte y empalme 5' y una región espaciadora que separa el sitio de corte y empalme 5' del dominio de unión a la diana.
4. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 3, que comprende además una secuencia de seguridad que comprende una o más secuencias complementarias que se unen a uno o ambos lados del sitio de corte y empalme 3'.
5. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 2 ó 3, que comprende además una secuencia de seguridad que comprende una o más secuencias complementarias que se unen a uno o ambos lados del sitio de corte y empalme 5'.
6. Una molécula de ácido nucleico según cualquier reivindicación precedente, que codifica una proteína que presenta un efecto terapéutico.
7. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que el efecto terapéutico es la muerte selectiva de células diana después del corte y empalme en trans.
8. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7, en la que la proteína codificada es una toxina para matar las células diana.
9. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7, en la que la toxina es la subunidad A de la toxina de la difteria.
10. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, 7, u 8 ó 9, en la que la región espaciadora contiene una secuencia de nucleótidos que contiene un codón de parada traduccional.
11. Una molécula de ácido nucleico según cualquier reivindicación precedente en forma de ADN.
12. Una molécula de ácido nucleico según cualquier reivindicación precedente en la que el pre-ARNm diana es de ser humano.
13. Un vector de ADN o vector vírico que expresa una molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 1, 3, 4, o una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 cuando acompañan a la reivindicación 1, 3 ó 4.
14. Un vector de ADN o vector vírico que expresa una molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 2 ó 5 o una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 cuando acompañan a la reivindicación 2 ó 5.

ES 2 279 531 T3

15. Una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para usar en el reconocimiento por componentes de corte y empalme nucleares celulares para producir un ARN quimérico terapéuticamente útil.

5 16. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15, en la que el ARN quimérico terapéuticamente útil codifica una proteína que presenta un efecto terapéutico.

10 17. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15, en la que el ARN quimérico terapéuticamente útil mata selectivamente las células diana.

18. Una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para usar en el reconocimiento por componentes de corte y empalme nucleares celulares para producir un ARN quimérico que sirva como un marcador.

15 19. Una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15, en la que el ARN quimérico terapéuticamente útil proporciona una molécula terapéutica activa que se expresa en las células diana.

20 20. Un vector según la reivindicación 13 ó 14, para usar en la expresión de una molécula de ácido nucleico que es reconocida por componentes de corte y empalme nucleares celulares para producir un ARN quimérico terapéuticamente útil.

21. Un vector según la reivindicación 20, en el que el ARN quimérico terapéuticamente útil codifica una proteína que tiene un efecto terapéutico.

25 22. Un vector según la reivindicación 20, en el que el ARN quimérico terapéuticamente útil mata selectivamente células diana.

30 23. Un vector según la reivindicación 13 o 14, para usar en la expresión de una molécula de ácido nucleico que es reconocida por componentes de corte y empalme nucleares celulares para producir un ARN quimérico que sirva como un marcador.

24. Un vector según la reivindicación 20, en el que el ARN quimérico terapéuticamente útil proporciona una molécula terapéutica activa que se expresa en las células diana.

35

40

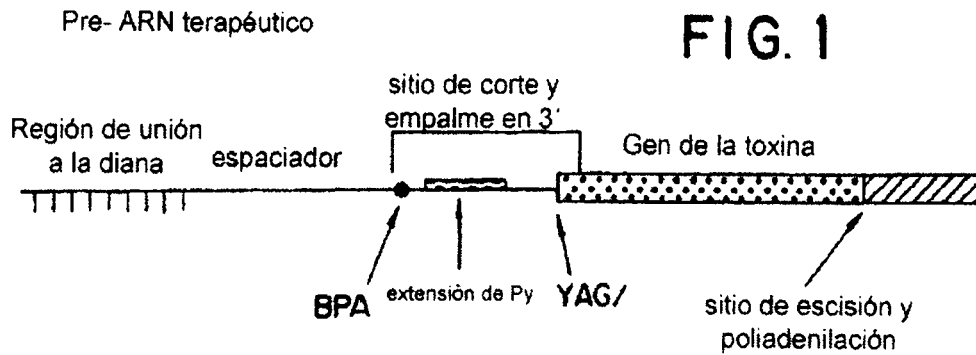
45

50

55

60

65



REGION DE "SEGURIDAD" DE PTM QUE CUBRE EL SITIO DE RAMIFICACIÓN Y EXTENSIÓN DE PIRIMIDINA MEDIANTE HOMOLOGIA DEBIL

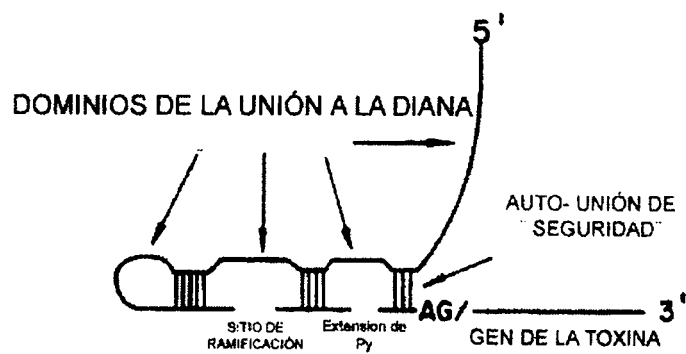
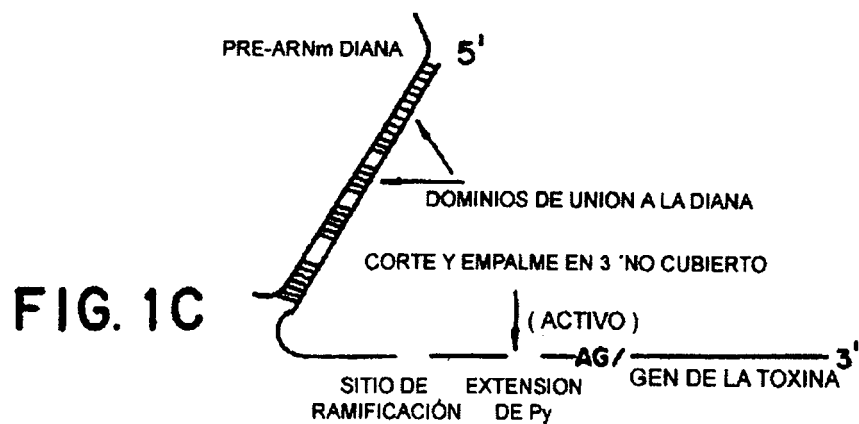


FIG. 1B

ELIMINACIÓN DE LA "SEGURIDAD" QUE CUBRE EL SITIO DE CORTE Y EMPALME EN 3' DE PTM UNIÉNDOSE A PRE-ARNm DIANA



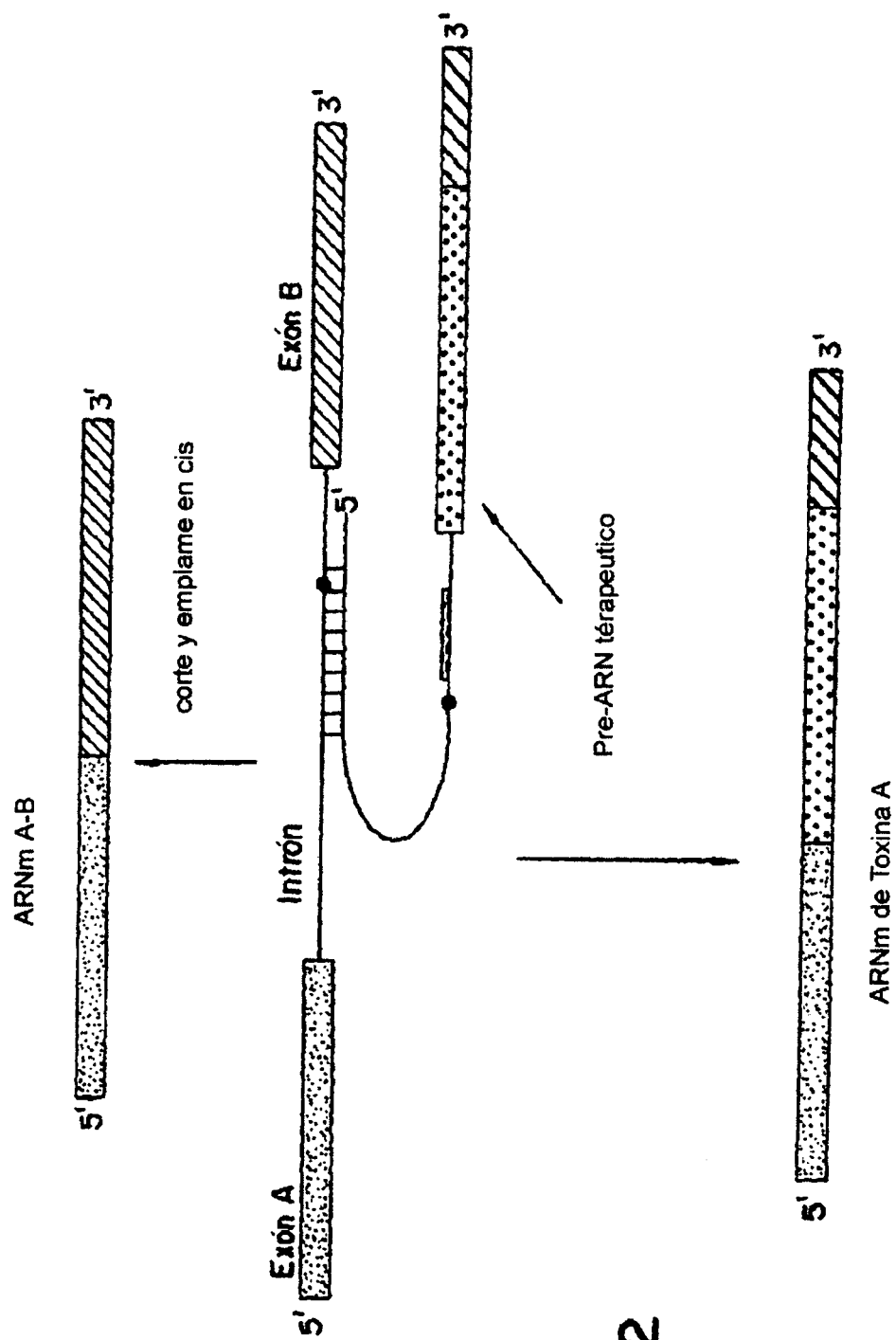


FIG. 2

FIG.3A

FIG.3B

FIG. 3

GEN DE TOXINA DE DIFTERIA (DT) DE CORINEBACTERIOFAGO BETA (C. diphtheriae) Y FLANCOS

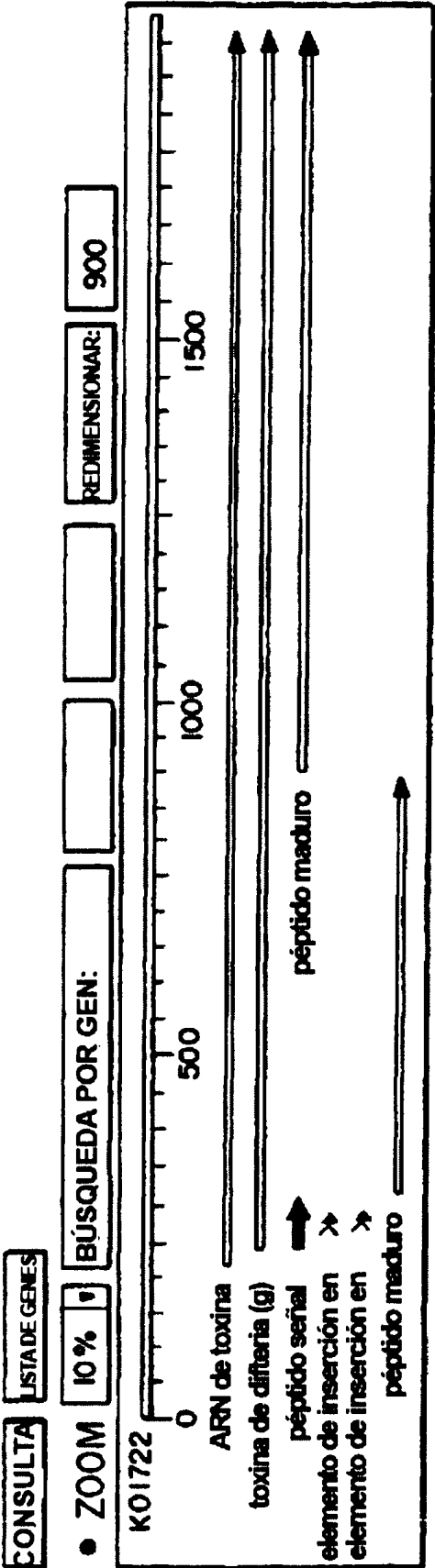


FIG. 3A

```

1  ccggcggttc gtatccagtg gctacactca ggttgtaatg attgggatga tgtacctgat
61  ctgagagoga ttaaaaactc attgaggagt aggtccogat tggtttttgc tagtgaagct
121 tagctagctt tcccatgta accaatctat caaaaaaggg cattgatttc agagcaccct
181 tataattagg atagctttac ctaattattt tatgagtcct ggtaagggga tacgttgtga
241 gcagaaaact gtttgcgtca atcttaatag ggggcgtact ggggataggg gccccacctt
301 cagcccatgc agggcgctgat gatgttgttg attcttctaa atcttttggt atggaaaact
361 tttcttcgta ccacgggact aaacctgggt atgtagattc cattcaaaaa ggtatacaaa
421 agccaaaatc tggtagacaa ggaaattatg acgatgattg gaaagggttt tatagtaccg
481 acaataaata cgacgctgcg ggatactctg tagataatga aaaccgcgtc tctggaaaag
541 ctggaggcgt ggtcaaagtg acgtatocag gactgaogaa ggttctcgca ctaaaagtgg
601 ataatgccga aactattaag aaagagttag gtttaagctt cactgaaccg ttgatggagc
661 aagtcggaac ggaagagttt atcaaaagggt tcggtgatgg tgcttcgctg gtagtgctca
721 gccttccttt cgctgagggg agttctagcg ttgaatatat taataactgg gaacaggoga
781 aagcgttaag cgtagaactt gagattaatt ttgaaaccog tggaaaacgt ggccaagatg
841 cgtatgatga gtatatggct caagcctgtg caggaaatcg tgcaggoga tcagtaggta
901 gctcattgtc atgcataaat cttgattggg atgtcataag ggataaaact aagacaaga
961 tagagtcttt gaaagagcat ggccctatca aaaataaaat gagcgaaagt ccaataaaaa
1021 cagtatctga ggaaaaagct aaacaatacc tagaagaatt tcatcaaacg gcattagagc
1081 atcctgaatt gtcagaactt aaaaccgtta ctgggacca tccgtatttc gctggggcta
1141 actatcgggc gtgggcagta aacgttgcgc aagttatcga tagcgaaaca gctgataatt
1201 tggaaaagac aactgctgct ctttcgatac ttcttggtat cggtagcgta atgggcattg
1261 cagacggtgc cgttcaccac aatacagaag agatagtggc acaatcaata gctttatogt
1321 ctttaattgt tgctcaagct attccattgg taggagagct agttgatatt ggtttcgctg
1381 catataattt tgrtagaggt attatcaatt tatttcaagt agttcataat tcgtataatc
1441 gtcccgogta ttctcgggg cataaaacgc aaccatttct tcatgaacgg tatgctgtca
1501 gttggaacac tgttgaagat tcgataatcc gaactgggtt tcaaggggag agtgggcaog
1561 acataaaaat tactgctgaa aataccocgc ttcaatcgc ggggtgtccta ctaccgacta
1621 ttcttgaaa gctggaogtt aataagtcca agactcatat ttccgtaaat ggtcggaaaa
1681 taaggatgcg ttgcagagct atagacgggt atgtaacttt ttgtgccctt aaatctcttg
1741 tttatgttgg taatggtgtg catgogaatc ttacgtggc atttcacaga agcagctcgg
1801 agaaaattca ttctaataaa atttcgtcgg attccatagg cgttcttggg taccagaaaa
1861 cagtagatca caccaagggt aattctaagc tatcgtattt tttgaaatc aaaagctgaa
1921 aggtagtggg gtogtgtgcc gg

```

FIG. 3B

FIG. 4, p. 1

Secuencias parciales de pre-moléculas terapéuticas experimentales (PTM) que muestran la REGIÓN DE UNIÓN A LA DIANA (complementaria al intrón 1 de β HCG, nucleótidos 903-886), la región espaciadora (en cursiva), el punto de ramificación (Adenosina del punto de ramificación en letra grande), la extensión de pirimidina (Py), y el sitio de corte y empalme en 3' (AG/). La secuencia (/GGCGCT...) representa la secuencia codificante completa de la subunidad A de la toxina de la difteria. Se muestran también secuencias de los constructos mutantes en los que se eliminó la extensión de pirimidina, el sitio de corte y empalme en 3' AG, y codones de parada insertados.

(1) **PTM+**: Tiene un dominio de unión complementario al punto de ramificación del intrón 1 de β HCG

| Eco RI | Xba I | Dominio de unión | Pto. Ramificación
 5' GAATTCTCTAGATGCTTCA~~CCCGGGCCTG~~ACTCGAGTACTAACTGGTACCTC

extensión de pirimidina sitio de corte y empalme en 3'/subunidad A de toxina de la difteria
 TTCTTTTTTTTCCTGCAG/GGCGCT.....

(2) **PTM + espaciador**: Tiene un espaciador de 30 nt entre el dominio de unión complementario y el punto de ramificación

Eco RI | Xba I | Dominio de unión | Región espaciadora
 5' GAATTCTCTAGATGCTTCA~~CCCGGGCCTG~~ACTCGAGAACATTATTATAACGTTGC

Pto. de ramificación extensión de pirimidina
 TCGAGTACTAACTGGTAACTCTCTCTTTTTTTTTCCTGCAG/GGCGCT....

(3) **PTM-**: Tiene complementariedad débil con el punto de ramificación del intrón 1 de β HCG

5' GAATTCTCTAGATCAGGCCCCGGTGAAGCACTCGAGTACTAACTGGTAOCTC
TTCTTTTTTTTCTGTCAGGGGGCT.....

(4) PTM "sin cohesión", TB con espaciador: Sin
complementariedad con el intrón 1 de β HCG

5' GAATTCTCTAGACAACGTTAATAATAATGTTCTCGAGAACATTATTATAACG
TTGCTCGAGTACTAACTGGTAOCTCTTCTTTTTTTTCTGTCAGGGGGCT....

FIG 4, P. 2

(5) **PTM + extensión de Py (-) AG (-) mutante:** Idéntica a (2), excepto que el aceptor de corte y empalme de cualquier extensión de pirimidina se muta para eliminar la funcionalidad del sitio de corte y empalme en 3'

5' GAATTCTCTAGATGCTTCACCCGGGCTGACTCGAGAACATTATTATAACGTTGC

TCGAGTACTAACTGGTACCCGAACTGGACGGGTTAAACGGGCT.....

extensión de pirimidina mutada, sin AG

(6) **PTM + extensión de Py (-) AG (-) mutante con codones de parada:** Lo mismo que (5), excepto que la extensión de pirimidina mutada (CCGTGATAATAGCGGTAAAC) contiene 3 codones de parada en fase (TGA, TAA, TAG)

5' GAATTCTCTAGATGCTTCACCCGGGCTGACTCGAGAACATTATTATAACGTTGC

TCGAGTACTAACTGGTACCCGTGATAATAGCGGTAAACGGGCT.....

extensión de pirimidina mutada, sin AG

(7) **PTM + AG (-) mutante:** Lo mismo que (2) excepto que el aceptor AG de corte y empalme en 3' se elimina (↑)

5' GAATTCTCTAGATGCTTCACCCGGGCTGACTCGAGAACATTATTATAACGTTGC

TCGAGTACTAACTGGTACCTCTCTTTTTTTTCCGGGCT.....

↑

FIG. 4, P.3

Construcción de PTM 1-8:

El pre-ARNm diana del modelo experimental, el gen 6 de β HCG (Fig. C) se restringió con Sac I y se clonó en pBS- (Stratagene). Esto produjo un inserto de 805 pb del nucleótido 460 al 1265 que incluye la región no traducida 5', el codón de inicio, el exón 1, el intrón 1, el exón 2 y la mayoría del intrón 2. Los transcriptos de ARN se producen usando un kit de transcripción de polimerasa T7 (Stratagene) a partir de estos clones de pBS-.

Para experimentos de corte y empalme in trans libre de células, las pre-moléculas terapéuticas se construyeron también en pBS-. Se amplificó por PCR la subunidad A de la toxina de la difteria (DTA) usando cebadores DT1 (GGCGCTGCAGGGCGCTGATGATGTTGTTG), que tiene un sitio Pst I en el extremo 5' y DT2 (GGCGAAGCTTGGATCCGACACGATTTCTGACAGG) que añade un sitio Bam I e Hind III al extremo 3' del producto de PCR. La DTA amplificada por PCR se digirió con Hind III y Pst I y se clonó dentro de pBS-. El clon pBS-DTA resultante se cortó con Eco RI y Pst I y se ligaron los siguientes oligonucleótidos, creando PTM + (PTM1).

**IN2-4: GGAAAAAAGAAGAGGTACCAGTTAGTACTCGAGTCAGGC
CCGGGTGAAGCATCTAGAG**

**IN3-1: AATTCTCTAGATGCTTCACCCGGGCCTGACTCGAGTACTAAC
TGGTACCTCTTCTTTTTTCTGCA**

Estos oligos contienen sitios de restricción para Eco RI, Xba I, Xho I, Kpn I y PstI. IN2-4 es complementario a IN3-1. El saliente 5' de IN3-1 se usa para ligar dentro del sitio Eco RI del clon pBS-DTA. El saliente 3' de IN3-1 se usa para ligar dentro del sitio Pst I del clon pBS-DTA, formando PTM1.

PTM-(PTM3) se crea por digestión de restricción de PTM1 con Eco RI y Xho I, eliminación electroforética en gel del fragmento del dominio de unión pequeño, y ligación en los

siguientes dos oligos:

IN-5: AATTCTCTAGATCAGGCCCGGGTGAAGCACTCGAG

IN-6: TGCTTCACCCGGGCCTGATCTAGAG

FIG. 4, P.4

PTM + espaciador (**PTM 2**) se produjo cortando PTM 1 con Xho I y ligando en los siguientes oligos. Los clones que tienen el espaciador B en la dirección con sentido del promotor T7 de pBS- se eligieron como PTM 2.

Espaciador A: TCGAGCAACGTTATAATAATGTTC

Espaciador B: TCGAGAACATTATTATAACGTTGC

PTM "sin cohesión" - con espaciador (**PTM4**) se crea por digestión de restricción de PTM 3 con Xba I y Xho I, y ligando los siguientes oligos. Los clones que tienen el espaciador B en la dirección con sentido del promotor T7 de pBS- se eligieron como PTM 4.

IN-7: CTAGACAACGTTATAATAATGTTC

IN-8: TCGAGAACATTATTATAACGTTGT

Espaciador A: TCGAGCAACGTTATAATAATGTTC

Espaciador B: TCGAGAACATTATTATAACGTTGC

CRM con espaciador (PTM 8) se creó por amplificación por PCR de un mutante de la subunidad A de la toxina de la difteria, CRM197 DTA (que era una mutación en el aminoácido 52, Gly a Glu, que elimina la actividad de la toxina, Uchida et al., 1973, JBC 248, 3838-3844) usando cebadores DT-1 y DT-2. El producto se digirió con Hind III y Pst I y se clonó en PTM 2 digerido con Hind III y Pst I, después de la electroforesis en gel de azarosa para eliminar el gen de la toxina de tipo natural de PTM 2.

PTM + extensión de Py (-) AG (-) (PTM 5) mutante se creó por digestión del clon PTM 2 con Pst I y nucleasa Mung Bean y

ES 2 279 531 T3

después ligando en los oligos delta AG-1 y delta AG-2. Delta AG-1 tiene un sitio de restricción Hpa I único.

Delta AG-1: CCGAACTGGACGCGGTTAAC

Delta AG-2: GTTAACCGCGTCCAGTTCGGGTAC

PTM + extensión de Py (-) AG (-) con codones de parada (PTM6) se creó por digestión de PTM 2 con Pst I y nucleasa Mung Bean y después ligando en los oligos delta AG-3 y delta AG-4. Delta AG-3 contiene tres codones de parada en fase "TGA, TAA, TAG" y tiene un sitio de restricción Hpa I único.

Delta AG-3: CCGTGATAATAGCGGTTAAC

Delta AG-4: GTTAACCGCTATTATCACGGGTAC

PTM + AG (-) (PTM 7) mutante se creó mediante amplificación por PCR de la subunidad A de la toxina de la difteria de PTM2 usando cebadores Delta AG-5 (ACTGGTACCTCTTCTTTTTTTCCTGCGGCGCTG), en el que el aceptor AG de corte y empalme en 3' se eliminó, y DT-2 (GGCGAAGCTTGGATCCGACA CGATTCCTGCACAGG), que tiene un sitio Hind III en el extremo 3'. El producto se digirió con Kpn I e Hind III y se clonó en PTM 2 digerido con Kpn I e Hind III, después de la electroforesis en gel de agarosa para eliminar el gen de la toxina de tipo natural de PTM 2.

Para estudios que implican células en cultivos de tejidos, las variaciones de PTM clonadas se digirieron con Eco RI e Hind III, después se ligaron en pCDNA 3.1- digerido con Eco RI e Hind III (Invitrogen), que es un vector de expresión de mamíferos que contiene un marcador de selección de la transformación (G418). Las secuencias de los diversos PTM se verificaron por secuenciación del ADN.

FIG. 4, P.5

FIG. 5B

ORIGEN

```

1  aaggagagagg tggggctcgg gctgaatccc tggttggggg gcatctgggt caagtggctt
61  ccctggcagc acagtcaogg ggagaccctc tctcactggg cagaagctaa gtccgaagcc
121  gggccctcc tgttaggttg gactgtggtg caggaaaggc tcaagtagag gagagttag
181  gcttcagtcc agcacittcc tgggtcaag gcctctcct ggttccaag accccaccat
241  aggcagaggc aggccttcc acaccctact ctctgtgcct ccagcctoga ctagtcccta
301  acactcgacg actgagtctc agaggctact tcaccgtggt ctccgcctca tcttgggcg
361  tagaccactg aggggagagg actggggtgc tcogctgagc cactcctgtg cctccctggc
421  ctgtgtact tctcgccccc gaagggttag tgtogagctc actccagcat cctacaacct
481  cctggtggcc ttggcggccc cacaaccccg aggtatgaag ccaggtacac caggcagggg
541  acgcaccaag gatggagatg ttccaggtaa gactgcaggg cccctgggca ccttccacct
601  ccttccaggc aatcactggc atgagaaggg gcagaaccgt gtgagctgtg gaaggacgcc
661  tctttctgga ggagtgtgac cccagtaag cttaacgtgg ggagttcct gagggtgggg
721  atctgaaatg ttgggtatc tcaggctcct cgggctgtgg ggtgggctct gaaaggcagg
781  tgtccgggtg gtgggtcctg aataggagat gccgggaagg gtctctgggt ctttgtgggt
841  ggtgtacct ggggatggg aaggccgggg ctcagggtg tggctcagg cccgggtgaa
901  gcagtgtcct tgtccaggg gctgtgtgtg ttgtgtgtg tgagcatgg cgggacatgg
961  gcatccaagg agccacttcg gccacggtgc cggccatca atgcacccct ggctgtggag
1021  aaggagggct gcccgtgtg catcacggtc aacaaccaca tctgtgccc ctactgccc
1081  accatggtga gctgcccggg gccggggcag gtgctgccac ctcagggcc aaccacaga
1141  ggcagcggg gaggaagggt ggtctgcctc tctggtcagg ggctgggaa tgggtgtgg
1201  gagggcagga acagagggt tctggacc ctagtctga gacctgtgg ggagctggg
1261  gagctcagct gaggcgtgg ccaggcaca tgcattcc ccactcaca cggcttcag
1321  acccggtgc tgcaggggt cctgcccggc ctgcctcagg tgggtgtcaa ctaccgat
1381  gtgcgcttc agtccatcc gctccctggc tgcccgcg ggtgaacc cgtggtctcc
1441  tacgcgtgg ctctcagctg tcaatgtgca ctctgcccgc gcagaccac tgactgcggg
1501  ggtccaagg accacccctt gacctgtgat gaccccgct tcaggcctc ctcttctca
1561  aaggccctc ccccgacct tocaagtcca tccgactcc cggggccctc ggacaccccg
1621  atctccac aataaaggct tctcaatcc cactctggcg gtgtc

```

FIG. 6A

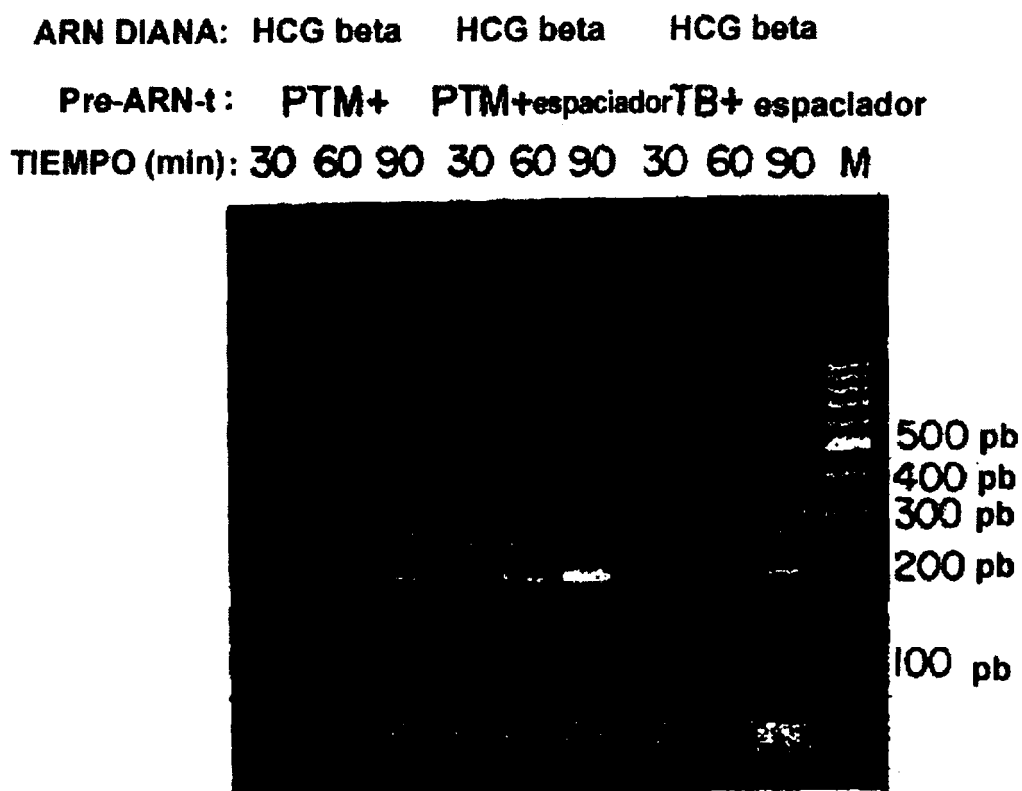


FIG. 6A LEYENDA

- **Corte y empalme en trans *in vitro*:** 250 ng de pre-ARNm de β HCG purificado en gel y 500 ng del ARN de PTM se hibridaron por calentamiento a 98°C en presencia de KCl 40 mM y MgCl₂ 2 mM y se enfriaron lentamente a 30°C. Las reacciones de corte y empalme se realizaron incubando 225 ng de la muestra de ARN hibridada en un volumen de reacción de 25 μ l que contenía tampón de corte y empalme 1X (KCl 40 mM, MgCl₂ 2 mM, fosfato de creatinina 5 mM y ATP 1 mM) y 8 μ l de extracto nuclear HeLa Spice (Promega) a 30°C. Se tomaron alícuotas en los puntos de tiempo indicados y las reacciones se pararon añadiendo un volumen igual de tampón de alta salinidad (urea 7 M, SDS al 0,5%, LiCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y EDTA 10 mM). Las muestras de ARN se extrajeron una vez con fenol:cloroformo seguido por cloroformo, se precipitaron con etanol, se lavaron con etanol al 70% y se secaron al aire.

- **Análisis por RT-PCR:** Se realizó el análisis de transcripción inversa (RT) acoplada con PCR con un ciclador térmico Perkin-Elmer usando o bien un kit EZ-RT PCR de protocolo de una enzima (Perkin-Elmer) o bien usando una transcriptasa inversa M-MLV dos (Gibco-BRL) y ADN polimerasa Taq (Perkin-Elmer). Los volúmenes de reacción RT típicos fueron 20 μ l que contenían 15 ng de ARN cortado y empalmado y cortado y empalmado en trans, 0,1 μ g de un cebador específico 3' que es complementario a la porción de la toxina de la difteria (nt 145-125 de DTA) del ARN cortado y empalmado en trans (DT-3, 5'-CATCGTCATAATTCCTTG TG), MgCl₂ 5 mM, 1 mM de cada NTPd, tampón de PCR 1X (KCl 50 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) y 10 U de transcriptasa inversa. Las reacciones de RT se realizaron a 42°C durante 15 min y para aquellas RT que usan M-MLV, la enzima se inactivó calentando a 95°C durante 5 min. El ADNc se amplificó después por PCR usando 0,1 μ g de un cebador

específico 5' para el componente diana del ARNm cortado y empalmado en trans, el exón 1 del ARN de β HCG (HCG-F, 5'-Biotin-ACCGGAATTCATGAAGCCAGGTACACCAGG, NT 514-534) y 2,5 U de ADN polimerasa Taq en un volumen de reacción de 100 μ l. El perfil de temperatura usado en 35 ciclos de amplificación fue, desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 60°C durante 40 s y extensión a 72°C durante 45 s seguido por una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de reacción se analizaron en un gel de agarosa al 2%. El producto esperado de corte y empalme en trans tiene 207 pb.

FIG. 6B

Secuencias de nucleótidos de fragmentos cortados y empalmados en trans amplificadas por RT-PCR. La RT-PCR amplificó un producto de 207 pb, que se secuenció directamente usando un cebador inverso DT-3, α -³³P ATPd y el kit Sequenase (Amersham, Life Science), y los productos se separaron por electroforesis en gel. Las flechas indican la posición de la unión del producto cortado y empalmado en trans.

Exón 1 de β HCG **566**
↓
 5- CAGGGGAAGCAOCCAAGGATGGAGATGTTTCAGGGGCGCTGATGATGTTGTTGATT
| 1^{er} nucleótido codificante de DTA

CTTCTAAATCTTTTGTGATGGAAACTTTTCTTGGTAOCCAAGGGACTAAAOCTGGTTAT
 GTAGATTGCATTCAAAAA -3

Secuencia del gel (Se invierte debido al uso de un cebador de secuenciación inverso)

Subunidad A de toxina de difteria >

TTTGAATGGAATCTACATAAOCAGGTTAGTCCCGTGGTACGAAGAAAAGTTTTC

ATCACAAAAGATTAGAGAATCAACAACATCATCAGCGGCGCTGGAACATCTCCAT

| Exón 1 de HCG beta

OCTTGGTGGTCCCTG - 3'

FIG. 7Modelo de enfermedad celular:

Se usó un modelo de cáncer humano para demostrar que la eliminación terapéutica (destrucción) de células diana que expresan un gen único (pre-ARNm) se logra usando las pre-moléculas terapéuticas de la invención. En este sistema, se probaron diversas líneas celulares cancerígenas, incluyendo la línea de cáncer de pulmón (H1299), una línea derivada del cáncer del cuello uterino (HeLa S3), y varias líneas de cáncer pancreático (C1469, C1997, H134 y C1682). Se ha descubierto que todas estas líneas celulares expresan moléculas diana β HCG como se determinan por RT/PCR y ensayos de inmunotinción. Las células se colocaron en placas a una densidad de 1×10^5 en placas de cultivo de tejidos de 60 mm y se cultivaron durante un mínimo de 24 horas. Se logró la transfección del ADN de los vectores de CMV y PTM (4 μ g/placa) usando lipofectamina (Gibco-BRL) por procedimiento convencional. En el día 4, las células transfectadas se trataron con tripsina y se pasaron 1:10 en un medio que contenía G418 (500 μ g/ml). El medio fresco que contenía G418 se suplementó cada 3-7 días. En el día 18, las colonias que quedaban después de la selección de G418 se lavaron con PBS- (Sigma), se fijaron en una disolución 3:1 de metanol/ácido acético durante 10 min, y se secaron al aire durante 10 min. Después se añadió una disolución de azul de metileno al 0,03% durante 10 min para teñir las colonias. Las colonias se lavaron con PBS-, se secaron al aire y se contaron las colonias mayores de 50 células. Los resultados para los primeros experimentos con H1299, una línea celular de cáncer de pulmón, y HeLa S3, derivada de un cáncer cervical son los siguientes:

Ensayos de toxicidad de transfección:Línea celular: H1299 Experimento 1:

ES 2 279 531 T3

<u>Estado</u>	<u>Número de colonias</u>	
	<u>Promedio, Placa A+B</u>	<u>Comentario</u>
Simulado (sin ADN)	0	
PTM 8	91,0	DTA mutante CRM, clon sin actividad de la toxina
Control de CMVp	34,3	Control de vector para el clon p53
P53 en CMVp	0	P53 expresada destruye a estas células, transformación + control
PTM 4	4,7	PTM sin unión
PTM 2	4,1	PTM de unión

Línea celular: H1299 Experimento 2:

<u>ESTADO</u>	<u>Número de colonias</u>	
	<u>Promedio, Placa A+B</u>	
PTM8	80,8	DTA mutante CRM
Vector pc3.1	115,3	Control de vector para clones de expresión de PTM
PTM 4	1,0	PTM sin unión
PTM 2	2,0	PTM de unión

Línea celular: HeLa S3 Experimento 1:

<u>ESTADO</u>	<u>Número de colonias</u>	
	<u>Promedio, Placa A+B</u>	<u>Comentarios</u>
Simulado (sin ADN)	88	Estas placas eran probablemente CMVp, pero simulado sin marcar
PTM 8	89	DTA mutante CRM

Control de CMVp	0	Estas placas eran probablemente CMVp, pero simulado sin marcar
p53 en CMVp	0	p53 expresada destruye a estas células, transformación + control
PTM 4	1,0	PTM sin unión
PTM 2	3,1	PTM de unión

FIG. 7 LEYENDA

• **Transfección de células H1299 y HeLa S3:** Se cultivaron células tumorales de pulmón H1299 y células de cáncer de cuello uterino derivadas de HeLa S3 en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal de ternera a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. La transfección se realizó usando lipofectamina (Gibco-BRL) según el procedimiento convencional del fabricante. Las células H1299 y HeLa S3 se colocaron en placas a una densidad de 1×10^5 en placas de 60 mm y se cultivaron durante al menos 24 horas. Las células o bien se transfectaron de manera simulada, sin ADN añadido, o bien se transfectaron con 4 µg de los siguientes vectores de ADN: pc3,1-PTM 2 (PTM 2 clonado en pc3.1-), pc3,1-PTM 4 (PTM4 clonado en pc3.1-), pc3.1-PTM 8 (idéntico a pc3.1-PTM 2, excepto por una mutación puntual que produce una mutación de Gly a Glu en la posición del aminoácido 52 de DTA, eliminando toda la actividad enzimática de la toxina), pcDNA3.1 (control de vector), CMVp p53 (p53 clonado en CMVp), y CMVp (control de vector). En el día 4, las células transfectadas se trataron con tripsina y se pasaron 1:10 en medio que contenía G418 (500 µg/ml). El medio se cambió cada de 3 a 7 días y la selección continuó durante al menos 2 semanas. En el día 18, las colonias que permanecían

después de la selección de G418 se lavaron con PBS- (Sigma), se fijaron en una disolución de metanol/ácido acético (3:1) durante 10 min y se secaron al aire durante 10 min. Después se añadió azul de metileno al 0,03% durante 10 min para teñir las colonias, se lavaron después una vez con PBS-, se secaron al aire y se contaron las colonias mayores de 50 células.