

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
29 de enero de 2015 (29.01.2015)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/011332 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/47 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070606

(22) Fecha de presentación internacional:
25 de julio de 2014 (25.07.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201300753 26 de julio de 2013 (26.07.2013) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [ES/ES]; Hospital Real - Avenida Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE JAÉN** [ES/ES]; OTRI-Campus Las Lagunillas s/n, Edif. B-1, E-23071 Jaén (ES).

(72) Inventores: **ARÁNEGA JIMÉNEZ, Antonia**; Universidad de Granada, Hospital Real - Avenida Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **BOULAIZ TASSI, Houria**; Universidad de Granada, Hospital Real - Avenida Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **CÁCERES GRANADOS, Blanca**; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **PRADOS SALAZAR, José, Carlos**; Universidad de Granada, Hospital Real - Avenida Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **CARRILLO DELGADO, Esmeralda**; Universidad de Granada, Hospital Real - Avenida Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **MELGUIZO ALONSO, Consolación**; Universidad de Granada, Hospital Real - Avenida Hospicio, s/n, E-18071 Granada (ES). **ORTIZ**

QUESADA, Raúl; Universidad de Jaén, OTRI-Campus Las Lagunillas s/n, Edif. B-1, E-23071 Jaén (ES). **DELGADO PÉREZ, Juan, Ramón**; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **CARPINTERO LOPEZ, Mario**; Herrero & Asociados, S.L, Alcalá, 35, E-28014 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE CONTAINING THE GEF AND APOPTIN GENES, AND THE USE THEREOF IN GENE THERAPY FOR COLON CANCER

(54) Título : POLINUCLEÓTIDO QUE CONTIENE LOS GENES GEF Y APOPTINA Y SU USO EN TERAPIA GÉNICA DEL CÁNCER DE COLON

(57) Abstract: The invention relates to a polynucleotide including the gef and apoptin genes, and the use thereof in gene therapy for treating colon cancer.

(57) Resumen: La invención consiste en un polinucleótido que incluye los genes gef y apoptina y su uso en terapia génica para tratar el cáncer de colon.



WO 2015/011332 A1

POLINUCLEÓTIDO QUE CONTIENE LOS GENES GEF Y APOPTINA Y SU USO EN TERAPIA GÉNICA DEL CÁNCER DE COLON

La presente invención se encuentra dentro del campo de la medicina y la biología molecular, y se refiere al uso de los genes *gef* y *apoptina* como terapia génica antitumoral, y concretamente para el tratamiento del cáncer de colon.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en hombres y el segundo en mujeres. La incidencia anual de cáncer de colon se estima en un millón, y aproximadamente 500.000 personas mueren cada año como consecuencia de un cáncer de colon en todo el mundo (Ferlay *et al.*, 2010. *Int J Cancer* 127:2893–917). Los recientes avances en la quimioterapia y la radioterapia han aumentado la supervivencia media de los pacientes.

La terapia génica, se presenta como una de las estrategias más prometedoras para el desarrollo de un tipo de terapia antitumoral que persigue la destrucción de las células neoplásicas, el cese o disminución de su capacidad de proliferación o la corrección del defecto celular que induce la alteración de la célula normal (Ortiz *et al.*, 2012. *Drug Discovery*, 7(3), 297-312).

Se ha descrito que la utilización de “genes suicidas” (genes que inducen a la muerte celular) en terapia génica dirigida hacia tumores, induce a la muerte celular de las células tumorales (Vassaux *et al.*, 2004. *Expert Opin Biol Ther* 4(4):519-30).

De entre estos genes suicidas, se ha descrito el efecto antitumoral del gen *gef*, con el fin de establecer una terapia combinada junto con agentes citotóxicos que potencien la acción de estos últimos (Ortiz *et al.*, 2012. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 66(7), 563-567). Se ha demostrado la utilidad de la transfección del gen *gef* en células humanas derivadas de cáncer de mama (MCF-7), mediante un vector de expresión simple con un promotor no específico inducido con dexametasona, lo que ha permitido demostrar la aparición de modificaciones ultraestructurales características de apoptosis (Boulaiz *et al.*, 2003. *Br J Cancer*. 7;89(1):192-8.). Así mismo, nuestros resultados demuestran que en líneas celulares humanas derivadas de melanoma (MS-36), el gen *gef* es capaz de inducir modificaciones en el ciclo celular, que conducen a una disminución significativa de la capacidad de proliferación (Boulaiz *et al.*, 2003. *Cancer Sci.*;94(6):564-8.; Boulaiz *et al.*, 2008. *Br J Dermatol*. 159(2):370-8.).

De la misma forma, se ha descrito el papel del gen *apoptina* en la inducción de la muerte celular y su posible uso en la terapia génica antitumoral (Zhou *et al.*, 2012. *Medical Oncology* 29(4), 2985-2991). La *apoptina*, una proteína de 121 aminoácidos codificada por un virus aviar, no se asemeja a ninguna otra proteína animal o viral secuenciada (Noteborn *et al.*, 1991. *J Virol* 1991; 65:3131-3139). La *apoptina* induce apoptosis en los timocitos de pollos jóvenes, así como en las células transformadas del pollo bajo condiciones de cultivo tisular (Danen-van Oorschot *et al.*, 2003. *J Biol Chem.*; 278:27729-27736; Leliveld *et al.*, 2003a. *Nucleic Acids Res* 2003a; 31:4805-4813, Leliveld *et al.*, 2003b. *J Biol Chem*; 278: 9042-9051.; Natesan *et al.*, 2006. *J Gen Virol* 2006; 87:2933-2940.). Como las células transformadas del pollo, las líneas tumorales humanas y de roedores son sensibles a la *apoptina* (Noteborn, 1999a. *Biogenic Amines* 1999; 15:73-91. Noteborn, 1999b. *Apoptosis* 1999; 4:317-319.). De hecho, la inyección conjunta de células de carcinoma hepático y del gen de la *apoptina* en los tumores inducidos en ratones produjo una disminución de la masa tumoral debido fundamentalmente a apoptosis (Shen *et al.*, 2003. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003; 23: 105-107). La importante y trascendente singularidad de la *apoptina* es su propiedad de inducir apoptosis únicamente en células neoplásicas y no en células normales por lo que la convierte en un potencial agente anti-tumoral (Pietersen *et al.*, 1999; *Gene Ther* 1999; 6:882-892. Maddika *et al.*, 2006. *Cancer Biol Ther* 2006; 5:10-19). Sin embargo, el cáncer colorrectal avanzado o recurrente sigue siendo incurable por los tratamientos convencionales (Berrino *et al.*, 2007. *Lancet Oncol* 8:773-883). Por lo tanto, es necesario explorar mejores opciones para el tratamiento del cáncer avanzado de colon. Se ha propuesto potenciar los efectos de los fármacos actuales y combinarlos con los posibles beneficios terapéuticos que podría aportar la terapia génica (Doloff *et al.*, 2010. *BMC Cancer* 2010; 10:487; Oh *et al.*, 2010. *Int J Mol Med* 2010; 25(3):369-76; Kojima *et al.*, 2010. *J Surg Res* 2009; 157(1): e63-70). La introducción de genes suicidas en células tumorales provocan un cierto grado de muerte celular de dichas células. Sin embargo, sería necesario encontrar una terapia génica en la que se introdujeran una combinación adecuada de genes para incrementar el efecto de la terapia, ya que el distinto mecanismo de acción de los mismos no conduce en general a resultados mejores que las terapias aisladas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado unos plásmidos retrovirales que incorporan el gen *gef* y el gen *apoptina*, proporcionando una composición farmacéutica y una preparación combinada que puede emplearse en la terapia antitumoral, y especialmente frente al cáncer de colon.

Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1) y de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2). Más preferiblemente se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1) y de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a) Secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido de la invención, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.
- b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido de la invención, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

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

I) un polinucleótido de la invención, y/o

II) al menos dos componentes, un **componente A**, de ahora en adelante componente A de la invención, que se seleccionan de entre:

- a) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos

un 95% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GEF (SEQ ID NO: 1),

b) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GEF (SEQ ID NO: 1).

c) Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende, al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

i) Secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según (a) o (b), para su transcripción *in vitro* o *in vivo*,

ii) Secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según (a) o (b), operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

d) La secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1)

Y un **componente B**, de ahora en adelante componente B de la invención, que se selecciona de entre:

e) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2),

f) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

g) Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende, al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

i) Secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según (e) o (f), para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.

ii) Secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según (e) o (f), operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

h) La secuencia aminoacídica que codifica para la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición es una composición farmacéutica. Más preferiblemente la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Aún más preferiblemente, además comprende otro principio activo.

Otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende un componente A de la invención y un componente B de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la preparación combinada además comprende otro principio activo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polinucleótido de la invención, de una construcción genética de la invención, de una composición de la invención, o de la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a un polinucleótido de la invención, una construcción genética de la invención, una composición de la invención, o la preparación combinada de la invención, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polinucleótido de la invención, de una construcción genética de la invención, de una composición de la invención, o de la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que cursa con proliferación celular anormal, o alternativamente, a un polinucleótido de la invención, una construcción genética de la invención, una composición de la invención, o la preparación combinada de la invención, para el tratamiento de una enfermedad que cursa con proliferación celular anormal. En una realización preferida de este aspecto de la invención la enfermedad que cursa con proliferación celular es el cáncer. En otra realización más preferida, la enfermedad es el cáncer de colon.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del componente A y el componente B de la invención, por separado, combinado o secuencial, en la elaboración de un medicamento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Determinación del efecto de la expresión de los genes *gef* y/o *apoptina* en la proliferación celular. Las células (a una concentración de 25×10^3 células por disco) se cultivaron durante 10 días para determinar su tasa de crecimiento. Los valores

representan la media $\pm$ la desviación estándar de los cultivos por cuadruplicado.

Fig. 2. Cuantificación de la inducción de apoptosis en células DLD-1 control y transformadas mediante fluorescence-activated cell sorting analysis. Las células fueron teñidas con Anexina V y PI para evaluar la muerte celular por apoptosis después de ser tratados con Dox durante 2 y 6 días, como se describe en la sección Materiales y Métodos. Los datos que se muestran pertenecen a 3 experimentos independientes.

Fig. 3. FACScan analysis of the cell cycle. Se analizaron las diferentes fases del ciclo celular de las células DLD-1, DLD1/gef, DLD1/apoptina, y DLD1/gef-apoptina tratadas con Dox durante 2 y 6 días. Los datos que se muestran pertenecen a 3 experimentos independientes.

Fig. 4. Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Tanto las células transfectadas como las no transfectadas, tratadas con Dox durante 2 y 6 días, fueron teñidas con JC-1. La fluorescencia roja representa las mitocondrias que tienen la membrana intacta, mientras que la fluorescencia verde representa las mitocondrias que tienen una baja despolarización de la membrana.

Fig. 5. Morfología ultraestructural de las células DLD-1, DLD1/gef, DLD1/apoptina, and DLD1/gef-apoptina tratadas con Dox durante 2 días para inducir la expresión de gef y/o apoptina. (Imágenes a y b). La morfología típica de las células parentales DLD-1 demostraron una complejión citoplasmática ligera. (Imágenes c,d y e). Células DLD1/gef que presentan gránulos y condensación de la cromatina, formación de vesículas y pronunciadas protuberancias en las mitocondrias. (Imágenes f, g y h). Célula DLD1/apoptina con membrana nuclear retorcida, retículo endoplasmático dilatado y sin estructura y formación de vesículas. (Imágenes i, j y k). Células DLD1/gef-apoptina con mitocondrias dilatadas y retículo endoplasmático y aparato de Golgi desorganizados. La masa de la cromatina compactada es muy densa y homogénea en textura. Se observaron tanto células necróticas como células apoptóticas con formación de vesículas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo sistema de terapia génica basado en la transfección de dos genes suicidas:

1. El gen *gef*, procariótico, que parece actuar de forma lesiva sobre las células a través de modificaciones en la membrana.

2. La *apoptina*, un gen codificado por un virus aviar, que induce apoptosis en los timocitos de pollos jóvenes, así como en las células transformadas del pollo bajo condiciones de cultivo tisular. Utilizando como modelo experimental la línea DLD-1 derivada de carcinoma de colon humano, hemos conseguido *transfectar satisfactoriamente estos genes* mediante un vector de inducción controlable, lo que nos ha permitido analizar los efectos de su expresión sobre las características biológicas de las células tumorales.

La expresión de los genes *gef* y *apoptina* solos o combinados inducida mediante doxyciclina en la línea DLD-1 provoca alteraciones morfológicas que indican la entrada de determinadas subpoblaciones celulares *en un proceso de muerte celular programada o apoptosis*. Sin embargo, el hecho más significativo es que, tal como se muestra en las **Fig.1** a la **Fig.3** la expresión combinada de ambos genes induce una significativa reducción de la tasa de proliferación en comparación tanto con las líneas parentales como con las que expresan dichos genes por separado, que se acompaña de una notable *alteración de la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular*. Los resultados demuestran por primera vez que la acción combinada de los genes *gef* y *apoptina* es mucho más citotóxica y tiene actividad antitumoral más intensa de la que tiene la expresión de dichos genes por separado. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de los genes *gef* y *apoptina* (bien directamente de su secuencia aminoacídica, o bien mediante su aplicación en terapia génica cn polinucleótidos y vectores que codifiquen y expresen los genes *gef* y *apoptina*, esto es, su secuencia aminoacídica) en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades proliferativas, preferiblemente para el tratamiento del cáncer, y aún más preferiblemente para el tratamiento del cáncer de colon.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de ahora en adelante polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1) y otro péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2). Más preferiblemente se refiere a un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de

traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1) y a otro péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

Puede esperarse que el grado de identidad/similaridad de las proteínas recogidas en las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, sean de al menos de un 80% o mayor, y más preferiblemente de al menos un 85%, un 90, un 95% o un 99%. La correspondencia entre la(s) secuencia(s) aminoacídica(s) de la(s) secuencia(s) putativa(s) y las secuencias recogidas en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1999)).

El término "homología", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre dos o más secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Puesto que dos secuencias se consideran homologas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se asume que valores superiores de similitud o identidad del 95% indicarían homología. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 95%, y preferiblemente un 99%, podrían mantener la función de las secuencias aminoacídicas recogidas en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucleic Acids Research 12: 287 (1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1999)).

La proteína GEF también está codificada por el locus UTI89_C0018 de *E.Coli*.

Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 1, (de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3 con número de acceso en el GenBank (NCBI) GenBank

(NCBI) AE005174.2). También se refiere a cualquiera de sus variantes biológicamente activas (actualmente se conocen 3 variantes).

En el contexto de la presente invención, la proteína GEF se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) Moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) Moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) Moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) Moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GEF. Entre las secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína GEF se encuentra la secuencia recogida en el GenBank (NCBI) AE005174.2, recogida en la secuencia SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 1

MLNTRVPLTDRKVKEKRAMKQHKVMIVALIVXCITAVVAALVTRKDLCEVHIRTGQ
TEVAVFTAYESE

SEQ ID NO: 3

ttactcggattcgtaagccgtgaaaacagcaacctccgtctggccagtcggatgtgaacctcacagaggtctttctc
gttaccagcgccgccactacggcggtgatacasatgacgatcagggcgacaatcatcaccttatgtctgttcattgct
ctcttctccttgaccttacggtcagtaagaggcactctacatgtgttcagcat

La proteína APOPTINA también llamada Cux-1, ORF1, hypothetical protein o proteína de la nucleocapsida, esta codificada por el locus CAVgp2 del virus de la anemia del pollo.

Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 2, con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_056774).

En el contexto de la presente invención, la proteína APOPTINA se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia

codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) Moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) Moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) Moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) Moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína APOPTINA. Entre las secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína APOPTINA se encuentra la secuencia recogida en el GenBank (NCBI) M55918.1, entre los pares de base 486-851, recogida en la secuencia SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 2

MNALQEDTPPGPSTVFRPPTSSRPLETPHCREIRIGIAGITITLSLCGCANARAPTLR
SATADNSESTGFKNVPDLRTDQPKPPSKKRSCDPSEYRVSELKESLITTTPSRPR
TAKRRIRL

SEQ ID NO: 4

ATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTTCAGGCC
ACCAACAAGTTCACGGCCGTTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTG
GTATCGCTGGAATTACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCGCGAATGCTCGC
GCTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTCAGAAAGCACTGGTTTCAA
GAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGAT
CCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACC
ACTACTCCCAGCCGACCCCGAACCGCAAAAAGGCGTATAAGACTGTAA

Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción genética de ADN o ARN, de ahora en adelante construcción genética de la invención, que comprende al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a) Secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido de la invención, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.

b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido de la invención, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

Un gran número de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia y forman parte de la presente invención.

Un "vector" es un replicón, o un vector integrativo, al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un "replicón" es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleotídica dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

Un vector integrativo es cualquier elemento genético que se integra y se mantiene estable en el genoma de una célula.

"Secuencia de control" se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

Como se usa aquí, el término "promotor" hace referencia a una región del ADN aguas arriba del punto de inicio de la transcripción, y en el particular, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula vegetal, sea el origen del promotor una planta o no. Ejemplos de promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores obtenidos de plantas, virus de plantas, y bacterias que pueden expresar genes en células de plantas, como *Agrobacterium* o *Rhizobium*. Ejemplos de promotores bajo el control del desarrollo incluyen promotores que preferentemente inician la transcripción en ciertos tejidos, tales como hojas, raíces, o semillas. Tales

promotores se denominan en esta memoria como preferentes de un tipo de tejidos. Hay otros promotores que inician la transcripción en un determinado tipo de tejidos, y se denominan como "tejido específicos". Un promotor "inducible" o "reprimible" es un promotor que se encuentra bajo el control del medio ambiente. Ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción son las condiciones anaeróbicas, o la presencia de luz. Los promotores de tejido específico, tejido preferido, específicos de un tipo celular, o promotores inducibles son tipos constituyen la clase de promotores "no constitutivos". Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales.

"Unidos de forma operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control "unida de forma operativa" a una secuencia que se transcribe a la secuencia nucleotídica de la invención, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Una "secuencia codificadora" o "secuencia codificante" es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a mRNA y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a mRNA, cDNA, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

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

I) un polinucleótido de la invención, y/o

II) al menos dos componentes, un **componente A**, de ahora en adelante componente A de la invención, que se seleccionan de entre:

a) un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GEF (SEQ ID NO: 1),

b) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GEF (SEQ ID NO: 1).

c) Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende, al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

i) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según (a) o (b), para su transcripción *in vitro* o *in vivo*,

ii) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según (a) o (b), operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

d) la secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1)

y un **componente B**, de ahora en adelante componente B de la invención, que se selecciona de entre:

e) un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2),

f) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

g) Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende, al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

i) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según (e) o (f), para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.

ii) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según (e) o (f), operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

h) la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición es una composición farmacéutica. Más preferiblemente la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Aún más preferiblemente, además comprende otro principio activo.

Otro aspecto de la invención se refiere a una preparación combinada, de ahora en adelante preparación combinada de la invención, que comprende un componente A de la invención y un componente B de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la preparación combinada además comprende otro principio activo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polinucleótido de la invención, de una construcción genética de la invención, de una composición de la invención, o de la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a un polinucleótido de la invención, una construcción genética de la invención, una composición de la invención, o la preparación combinada de la invención, para su uso como medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un polinucleótido de la invención, de una construcción genética de la invención, de una composición de la invención, o de la preparación combinada de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que cursa con proliferación celular anormal, o alternativamente, a un polinucleótido de la invención, una construcción genética de la invención, una composición de la invención, o la preparación combinada de la invención, para el tratamiento de una enfermedad que cursa con proliferación celular anormal. En una realización preferida de este aspecto de la invención la enfermedad que cursa con proliferación celular es el cáncer. En otra realización más preferida, la enfermedad es el cáncer de colon.

Por proliferación anormal » se entiende una proliferación que es independiente de los mecanismos de regulación normales, por ejemplo la interrupción de la

proliferación celular causada por la intervención de la apoptosis (muerte celular programada)

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del componente A y el componente B de la invención, por separado, combinado o secuencial, en la elaboración de un medicamento. Más preferiblemente, se refiere al uso del componente A y el componente B de la invención, por separado, combinado o secuencial, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer, y aún más preferiblemente, para el tratamiento del cáncer de colon.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es una enfermedad que cursan con proliferación celular, más preferiblemente el cáncer, y aún más preferiblemente el cáncer de colon.

Debe enfatizarse que el término "preparación combinada" o también denominada "yuxtaposición", en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición, para poder encontrarse 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.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa 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.

Tanto las composiciones de la presente invención, así como la preparación combinada de la invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en

disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Se conocen numerosas formulaciones y vehículos para la terapia génica. Así, el ADN de interés puede introducirse en las células diana mediante métodos virales o no virales, o mediante métodos mixtos. Entre los métodos virales se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarnos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), herpes virus, o vectores conocidos como "pseudotyped", en los cuales la cubierta vírica de proteínas silvestre ha sido remplazada por péptidos de otros virus, o por proteínas quiméricas, que constan de las partes de la proteína vírica necesarias para su incorporación en el virión, así como las secuencias que supuestamente a interaccionar con receptores específicos de proteínas celulares. Entre los métodos no virales se encuentran los métodos para introducir ADN desnudo, como la electroporación, la sonicación, o el uso de la biobalística, nanopartículas, dendrímeros, lipoplexes y poliplexes, entre otros. Entre los métodos mixtos se encuentran, por ejemplo, los virosomas, que combinan liposomas con un virus inactivado. Estos métodos son ilustrativos y no limitativos de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se emplea un vector viral que es el sistema de expresión RevTet-On, y que contiene los vectores pRevTet-On y pRev-TRE.

Tales composiciones o preparaciones combinadas y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso,

intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un polinucleótido, de una construcción genética, de una composición, o de la preparación combinada que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos un polinucleótido, de una construcción genética, de una composición, o de la preparación combinada y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

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 dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que pone de manifiesto el aumento del efecto antitumoral de la terapia génica en la que se combinan los genes *gef* y *apoptina*.

Material y métodos:

1. Cultivo celular

La línea celular DLD-1 de carcinoma colorectal fue obtenida del Servicio de Inmunología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España). La línea celular empaquetadora de vectores virales PT67 fue comprada a Clontech, Palo Alto, California, EEUU. Las líneas DLD-1 y PT67 se cultivaron a 37 °C en una atmosfera al 5% de CO₂ con un medio de cultivo DMEM (Dubelcco's modified Eagle Medium)(Sigma, St. Louis, MO, EEUU) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) (Sigma), 2% de L-glutamina, 2.7% de bicarbonato sódico, 1% de tampón Hepes, 40 mg/l de gentamicina y 500 mg/l de ampicilina.

Para el cultivo de las líneas DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina, and DLD1/Tet-On-gef-apoptina se utilizaron las mismas condiciones y el mismo medio suplementado con higromicina B (0.4 mg/mL, Sigma) y doxíciclin (Dox, 0.2 mg/mL). Este último se utiliza para inducir la expresión de los genes *gef* y *apoptina*. Los estudios se realizan por tanto en cuatro líneas celulares:

1. DLD-1 derivada de carcinoma de colon, fue suministrada por la Sección de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de Las Nieves de Granada.
2. DLD-1/gef que expresa el gen *gef* (obtenida mediante infección de la línea DLD-1 con un vector viral que expresa el gen *gef*).
3. DLD-1/apop que expresa el gen *apoptina* (obtenida mediante infección de la línea DLD-1 con un vector viral que expresa el gen *apoptina*).
4. DLD-1/gef-apop que expresa los genes *gef* y *apoptina* (obtenida mediante infección de la línea DLD-1 con vectores que expresan los genes *gef* y *apoptina*).

2. Construcción de los plásmidos retrovirales

Para la construcción de los vectores se usó el sistema RevTet-On que incluye los vectores pRevTet-On y pRev-TRE, y la línea celular RetroPack PT67, comprados a Clontech, Palo Alto, California, EEUU. El gen *apoptina* fue cedido por el Dr. Mahvash Tavassoli, del Instituto Rayne, King's College, London, y el gen *gef* fue cedido por el Dr. J.L. Ramos, de la Estación experimental del Zaidín del CSIC, Granada, España. El inserto completo de *gef*, flanqueado en sus extremos 3' y 5' por los sitios de restricción BamH I y Hind III respectivamente, fue amplificado mediante PCR. El producto de PCR fue digerido por BamH I y Hind III e insertado en el vector pRev-TRE. Esta construcción se usó para transformar E.Coli. Las células se pusieron en un medio de cultivo LB con ampicilina. Se seleccionó un clon positivo (con pRevTRE-gef) para la transfección de las células DLD-1 después de haber comprobado mediante enzimas de restricción y PCR que la secuencia del inserto y su orientación son correctas. El vector pRevTet-On y el vector pRevTRE-apoptina fueron clonados de la misma forma.

3. Estudio de la proliferación celular

Las células DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina, and DLD1/Tet-On-gef-apoptina (25×10^3) fueron cultivadas en placas de 6 pocillos bajo las condiciones descritas anteriormente. Después de 24h, se renovó el medio de cultivo y se añadió 0.2 mg/mL de Dox (Sigma) para inducir la expresión de los

genes. Las células pertenecientes a los grupos control no fueron tratadas con Dox. El objetivo de tratar las células DLD 1 con Dox es verificar que Dox no tiene efectos en el crecimiento celular. El medio (con o sin Dox) de todas las células se renovó en días alternativos hasta el final del experimento. El experimento fue realizado por cuadruplicado. En los días 0, 2, 4, 6, 8, y 10 del tratamiento, las células fueron teñidas con sulforodamina B (SRB) para realizar un ensayo colorimétrico usando el aparato Titertek Multiscan (Flow, Irvine, California) a 492 nm. La recta de calibrado para el ensayo con SRB se realizó para cada pase de células DLD 1 antes de cada experimento de proliferación celular.

4. Detección de la apoptosis mediante tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio.

Se utilizó el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen, San Diego, CA, EEUU) para la detección de apoptosis mediante citometría de flujo. Las células (1×10^6) DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina, and DLD1/Tet-On-gef-apoptina se colocaron en frascos de cultivo de 75-cm² y se cultivaron toda la noche. Seguidamente se incubaron con Dox durante 2 y 6 días. Las 4 líneas celulares fueron despegadas con PBS-EDTA, lavadas dos veces con PBS frío (1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.2) y centrifugadas a 500g durante 10 min. A continuación fueron resuspendidas en 100 µl de la solución de binding buffer (10 mM hepes, pH 7.1; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂), teñidas con anexina V (1 µl de anexina V-FITC (25 µg/ml), 10 µl de binding buffer, 10 µl yoduro de propidio (PI) (50 µg/ml), 79 µl H₂O) e incubadas en oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo, se les añadió 500 µl de la solución binding buffer y las células (10 000 por muestra) fueron inmediatamente procesadas con citometria de flujo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU).

5. Análisis ultraestructural

Las células DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina and DLD1/Tet-On-gef-apoptina tratadas con Dox durante 6 días fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% en un tampón (pH 7.4) con cacodilato de sodio 0.1 M durante 1h a temperatura ambiente.

El pellet y la monocapa fueron fijadas posteriormente con tetraóxido de osmio al 1% en un tampón con cacodilato 0.1 M durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente, deshidratados en etanol. Las células fueron despegadas del recipiente mediante el tratamiento con óxido de propileno y fueron embebidas en Epon 812. Después de la polimerización, el plástico fue eliminado y se cortaron secciones ultrafinas paralelas y perpendiculares a la superficie del frasco de cultivo. Las secciones se tiñeron con citrato de acetato de uranilo y plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H7000.

6. Análisis del ciclo celular

Las células cultivadas en monocapa fueron despegadas, lavadas dos veces con un tampón simple (100 mg glucose; 100 ml PBS sin Ca²⁺ or Mg²⁺) y fijadas con etanol frío al 70% (vol/vol) durante una semana. A continuación, las células fueron centrifugadas, lavadas una vez con un tampón simple y resuspendidas en una solución de PI (50 µg/ml PI, 0.5 mg/ml RNasa en tampón simple, pH 7.4) durante 30 min en oscuridad. El análisis con Fluorescence-activated cell sorter se llevó a cabo a las 2 y 96h después de la inducción. Los datos de 10 000 células por muestra fueron recogidos y analizados con el programa Cellfit de FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU).

7. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Se usó la sonda *dual-emission potential-sensitive*, 5', 6, 6'-tetra-chloro-1, 1', 3, 3'-tetraetil-imidacarbocianina yodida (JC-1) para medir el potencial mitocondrial de membrana ($\Delta\psi_m$). JC-1 es un monómero verde fluorescente a bajo potencial de membrana, que forma agregados rojo fluorescentes promovido por un elevado potencial de membrana.

La proporción de fluorescencia roja /verde de JC-1 depende únicamente del potencial de membrana e indica la despolarización de la misma. Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, incubadas con 2 mg/L de JC-1 a 37 °C durante 20 min y analizadas por citometría de flujo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) con unos valores de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente.

Resultados

1. Detección de la expresión de los genes *gef* y *apoptina* en las células transfectadas.

El chequeo en gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR permitió observar la amplificación de un fragmento de 170 pb correspondiente al gen *gef* y otro de 473pb correspondiente al gen de la apoptina, resultado de la presencia del ARNm de ambos genes, en las células transfectadas lo que demuestra una correcta expresión tras la inducción con dexametasona. La PCR fue negativa para las células transfectadas con el vector vacío y para las células no transfectadas. Para demostrar la integridad de las preparaciones de ARN, se realizó PCR utilizando primers específicos de α -actina. En todos los casos el producto de esta amplificación fue detectado y fue de la misma intensidad, lo que indicó la no-degradación del ARN y que la PCR fue realizada a partir de las mismas cantidades de ARN.

2. Estudio del crecimiento celular

El efecto inducido por los genes suicidas se analizó mediante la medida de la proliferación celular con el ensayo MIT (Figura 1). En la curva que representa la tasa de inhibición del crecimiento celular no se aprecian diferencias significativas entre las células DLD-1 tratadas con Dox y las que no tratadas. Se observó una inhibición del crecimiento del 36.86% en las células DLD1/Tet-On-*gef* con respecto a las células control después de 2 días de incubación con Dox, y una inhibición del 50.19%, 29.53%, 31.44%, y 35.34% después de 4, 6, 8, y 10 días de incubación, respectivamente ($P < 0.001$). En las células DLD1/Tet-On-apoptina tratadas con Dox se observó una inhibición del crecimiento del 50.41%, 71.4%, 64.7%, 43.46%, y 47.8% después de 2, 4, 6, 8, y 10 días de incubación, respectivamente ($P < 0.001$). En las células DLD1/Tet-On-*gef*-apoptina transducidas con los genes *gef* y *apoptina*, se observó una inhibición del crecimiento del 51.30% después de 2 días de incubación con Dox respecto a las células control. De la misma forma, se observó una inhibición del crecimiento del 64.1%, 45.45%, 51.9%, y 65.07% después de 4, 6, 8, y 10 días de incubación, respectivamente ($P < 0.001$). Por tanto, hasta el día 6 de tratamiento con Dox, la inhibición de la proliferación en las células DLD1/Tet-On-*gef*-apoptina fue mayor que en las células que solo expresan el gen *gef*. Sin embargo, dicha inhibición fue muy similar en las células que solo expresan apoptina, sin diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, a los 10 días de incubación, los genes *gef* y apoptina causan una inhibición de la proliferación del 35.9% y el 47.95%, mientras que la acción conjunta de ambos genes causa una inhibición del 65.13% ($P < 0.001$).

3. Análisis del efecto apoptótico

Para cuantificar el alcance de la apoptosis mediante citometría de flujo, se tiñeron las células simultáneamente con anexina V-FITC y IP nonvital dye para diferenciar: células viables (negativas para ambas tinciones), células en apoptosis temprana (positivo para anexina V-FITC y negativo para PI), células en apoptosis tardía (positivas para anexina V-FITC y PI) y células necróticas (positivas para PI). En el cultivo control de DLD-1, el 85% de las células era viables, el 2,11% estaban en apoptosis temprana, 2.76% estaban en apoptosis tardía o en las últimas etapas de la apoptosis, y un 10,12% eran necróticas ($P < 0.001$), tal y como se observa en la figura 2. No se observaron diferencias entre las células DLD-1 tratadas con Dox y las no tratadas durante la primera semana. En el grupo DLD1/Tet-On-gef tratado con Dox durante 2 y 6 días, el 66.23% y 24.81% de las células eran viables, el 14.19 % y el 4.59% fueron apoptóticas, el 0.92% y el 37.18% estaban en apoptosis tardía o en las últimas etapas de la apoptosis, y el 18.66% y el 33.41% fueron necróticas, respectivamente. En el grupo DLD1/Tet-On-apoptina tratado con Dox durante 2 y 6 días, los porcentajes correspondientes son 35.7% y 23.35%, 6.8 % y 13.42%, 29.34% y 40.10%, y 28.16% y 23.36%, respectivamente ($P < 0.001$). Finalmente, en las células DLD1/Tet-On-gef-apoptina tratadas con Dox durante 2 y 6 días, los porcentajes correspondientes son 31.77% y 8.69%, 23.07% y 6.76%, 8.96% y 38.61%, y 36.19% y 45.94%, respectivamente ($P < 0.001$).

4. Modulaci3n del ciclo celular

El cultivo de células DLD-1 contenía un 70.76% de células en G1/G0, un 19.23% de células de fase S y un 10.01% de células en G2/M. Sin embargo, después de 2 días de inducci3n con Dox, las células DLD1/Tet-On-gef-apoptina mostraron una disminuci3n gradual de células en fase G1 y una acumulaci3n de células en fase S y en fase G2/M. Después de 6 días de inducci3n, el incremento del número de células en fase S (29.94%), y en fase G2/M (27.01%) y la disminuci3n de la poblaci3n de células en fase G1 (43.04% G1/G0) fueron aún más acentuadas.

After 6 days of induction, the increase in S-phase (29.94%), and G₂/M-phase (27.01%) cell populations and the decrease in G₁ phase cells (43.04% G₁/G₀ cells) were even more marked (Figura 3).

5. Cambios morfol3gicos

Se observ3 al microscopio 3ptico la morfología de las células DLD-1 transfectadas con un solo gen y las transfectadas con ambos genes después de la inducci3n con

Dox, y se apreciaron células más redondeadas y la pérdida de su adherencia al frasco de cultivo. No se apreciaron cambios morfológicos en las células DLD-1 transfectadas con el vector vacío con respecto a las no transfectadas (no se muestran los datos). Las células DLD-1 transfectadas con los genes *gef* y/o *apoptina* se analizaron con un microscopio electrónico de transmisión profundizar en el estudio de la citotoxicidad de dichos genes. Mediante el análisis de imágenes ultraestructurales, se confirmó la presencia de células muertas por apoptosis tanto en las células transfectadas con el gen *gef* como en las transformadas con el gen *apoptina*. Como se puede apreciar en las imágenes a y b de la figura 5, las células control son grandes y redondeadas o poligonales, con bordes bien definidos y abundante citoplasma granular, con núcleos de tamaños variables; las células tienen mitocondrias con crestas bien definidas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi así como ribosomas libres o asociados al retículo endoplasmático. El núcleo de las células que expresa el gen *gef* y/o el gen *apoptina* presentan las características ultraestructurales de la apoptosis, incluyendo condensación de la cromatina, forma de media luna, marginación y formación de vesículas, tal y como se observa en las imágenes c, d, e, f, g, h, i, j y k de la figura 5. En las células transfectadas únicamente con el gen *gef*, se observaron grandes protuberancias en las mitocondrias en el día 2 del tratamiento con Dox. (Imágenes c, d y e de la figura 5). En las células transfectadas únicamente con el gen *apoptina*, se apreció la dilatación y destrucción del retículo endoplasmático (imágenes e, f y g de la figura 5). En las células transducidas con ambos genes, se observó la dilatación de la mitocondria y el RE y la destrucción de aparato de Golgi (imagen j de la figura 5), así como la presencia de células necróticas (imagen i de la figura 6).

6. Modulación del potencial de membrana mitochondrial.

Se midió el potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\psi_m$) mediante la sonda JC-1 con el objetivo de determinar si la apoptosis de las células DLD-1 inducida por los genes *gef* y *apoptina*, solos o combinados, se lleva a cabo por la vía mitocondrial. LA sonda se acumula específicamente en la mitocondria en cantidades que varían según el potencial de membrana. En las organelas con bajo potencial de membrana se acumula una pequeña cantidad de moléculas JC-1, por lo que emiten fluorescencia verde (485 excitación/535 emisión). A altas concentraciones (alto potencial de membrana), los monómeros de la sonda forman

agregados y emiten una fluorescencia roja (535 excitación /590 emisión). Por tanto, la pérdida de potencial de membrana se traduce en un cambio de rojo a verde. Después de 2 y 6 días de tratamiento con Dox, las células transformadas con ambos genes suicidas mostraron una disminución del potencial de membrana mucho mayor que en el caso de las células que solo expresan gef o apoptina, o las control, tal y como se observa en la figura 4. Este resultado sugiere que la coexpresión de gef y apoptina induce la apoptosis mediante un mecanismo dependiente de la mitocondria.

En resumen, estos experimentos muestran que la expresión de los genes gef y apoptina, solos o combinados, inducida mediante doxyciclina en la línea DLD-1 provoca alteraciones morfológicas que indican la entrada de determinadas subpoblaciones celulares en un proceso de muerte celular programada o apoptosis. Sin embargo, el hecho más significativo es que la expresión combinada de ambos genes induce una significativa reducción de la tasa de proliferación en comparación tanto con las líneas parentales como con las que expresan dichos genes por separado, que se acompaña de una notable alteración de la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular.

Los resultados demuestran por primera vez que la acción combinada de los genes gef y apoptina es mucho más citotóxica y tiene actividad antitumoral más intensa de la que tiene la expresión de dichos genes por separado.

REIVINDICACIONES

1.- Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1) y de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

2.- Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica de la proteína GEF (SEQ ID NO: 1) y de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica de la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).

3.- Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende, al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a) Secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.
- b) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.

4.- Una composición que comprende:

I) un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, y/o

II) al menos dos componentes, un **componente A** que se seleccionan de entre:

a) un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GEF (SEQ ID NO: 1),

b) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GEF (SEQ ID NO: 1).

c) Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende, al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:

- i) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según (a) o (b), para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.
- ii) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según (a) o (b), operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.
- d) la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína GEF (SEQ ID NO: 1) y un **componente B**, que se selecciona de entre:
 - e) un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 95% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2),
 - f) Un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido que presenta una identidad de al menos un 99% con la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2).
 - g) Una construcción genética de ADN o ARN, que comprende, al menos uno de los siguientes tipos de secuencias:
 - i) secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, un polinucleótido según (e) o (f), para su transcripción *in vitro* o *in vivo*.
 - ii) secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende un polinucleótido según (e) o (f), operativamente enlazado con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar.
 - h) la secuencia aminoacídica que codifica para la proteína APOPTINA (SEQ ID NO: 2)
- 5.- La composición según la reivindicación 4, que es una composición farmacéutica.
- 6.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 7.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que además comprende otro principio activo.

- 8.- Una preparación combinada que comprende un componente A y un componente B, según se define en la reivindicación 4.
- 9.- La preparación combinada según la reivindicación anterior, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10.- La preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, que además comprende otro principio activo.
- 11.- El uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de una construcción genética según la reivindicación 3, de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, o de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la elaboración de un medicamento.
- 12.- El uso de un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de una construcción genética según la reivindicación 3, de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 4-7, de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que cursa con proliferación celular anormal.
- 13.- El uso de un polinucleótido, de una construcción genética, de una composición, o de la preparación combinada según la reivindicación anterior, donde la enfermedad que cursa con proliferación celular es el cáncer.
- 14.- El uso de un polinucleótido, de una construcción genética, de una composición, o de la preparación combinada según la reivindicación anterior, donde la enfermedad que cursa con proliferación celular es el cáncer de colon.
- 15.- El uso de la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 11-14 donde el componente A y el componente B de la invención se administran de manera simultánea, combinada o secuencial.

1/5

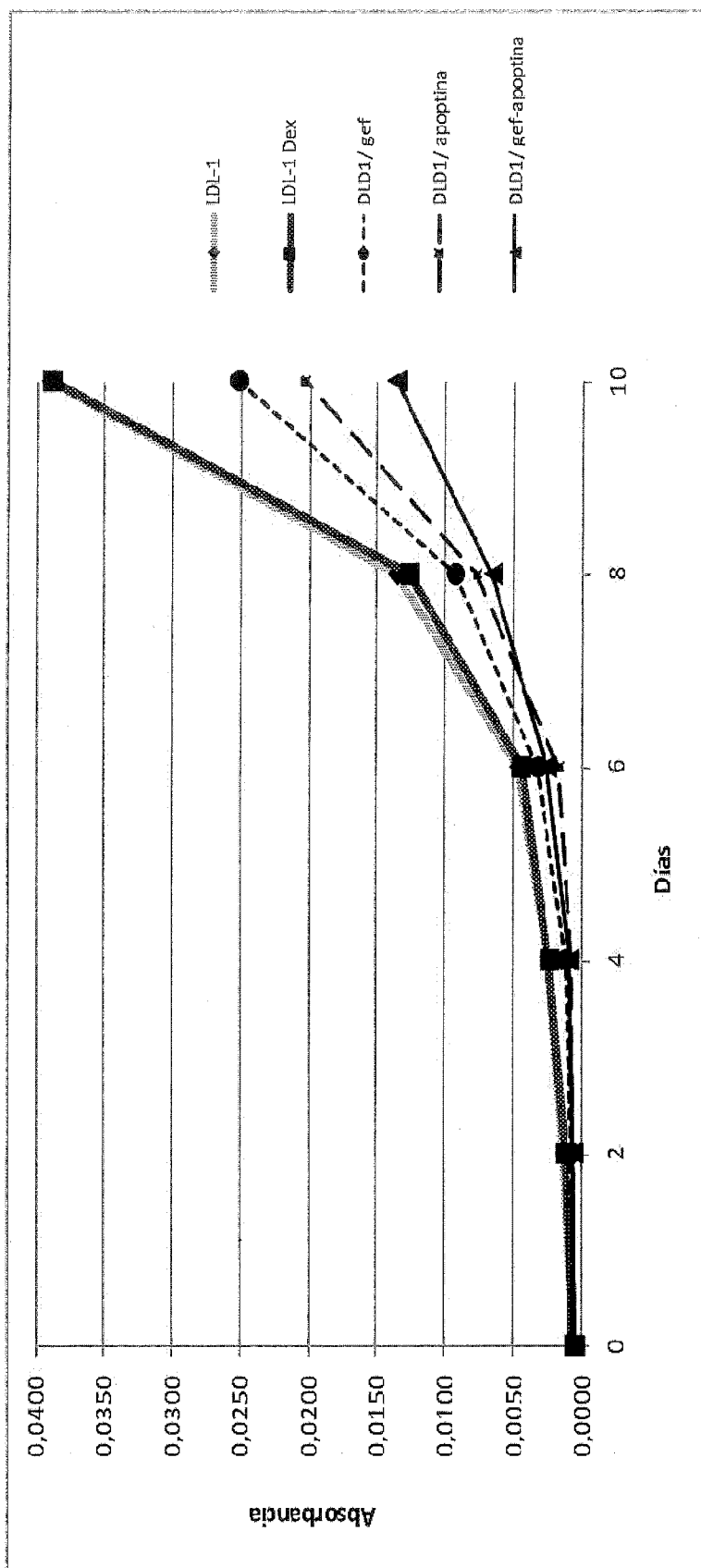


FIG. 1

2/5

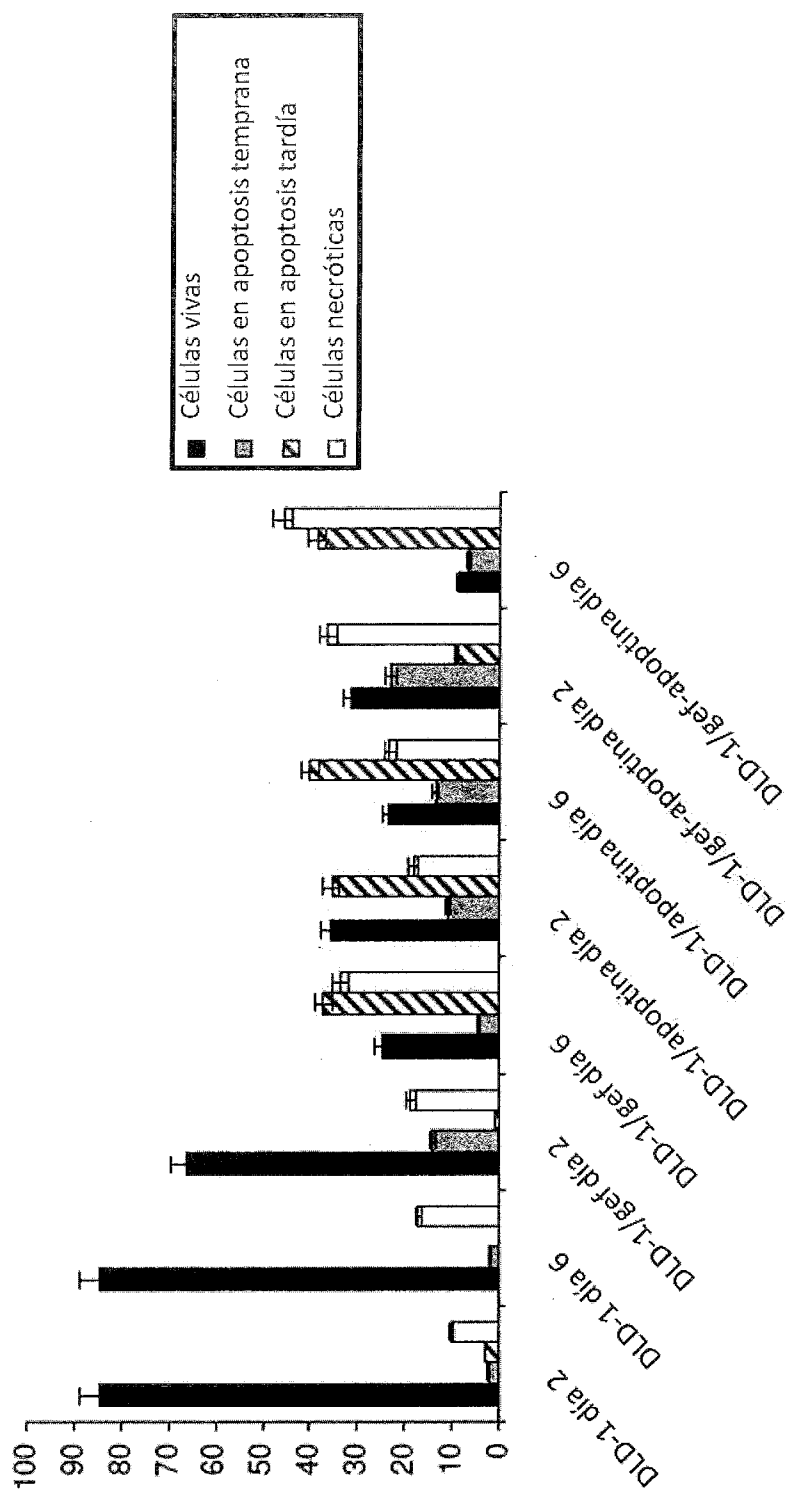


FIG. 2

3/5

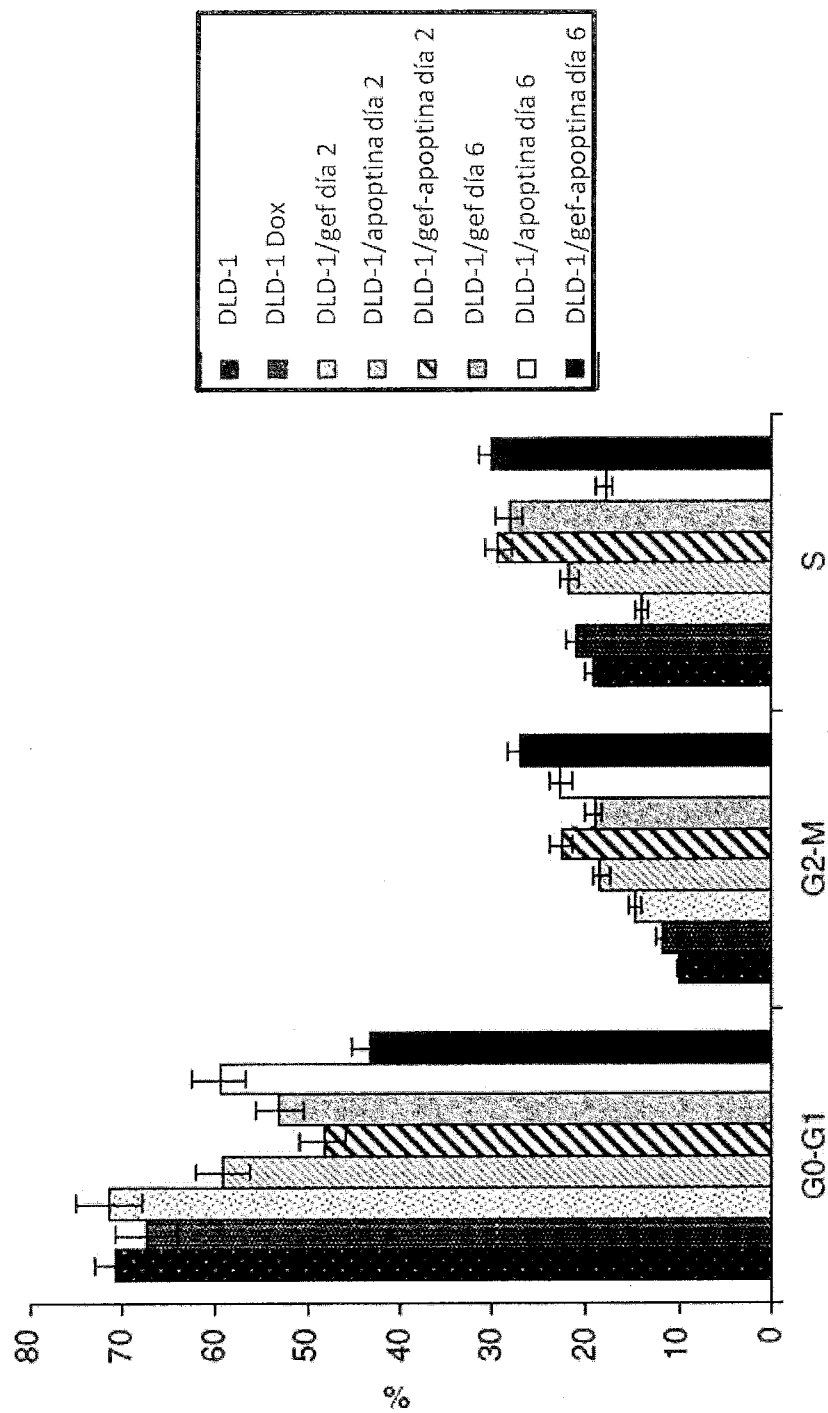


FIG. 3

4/5

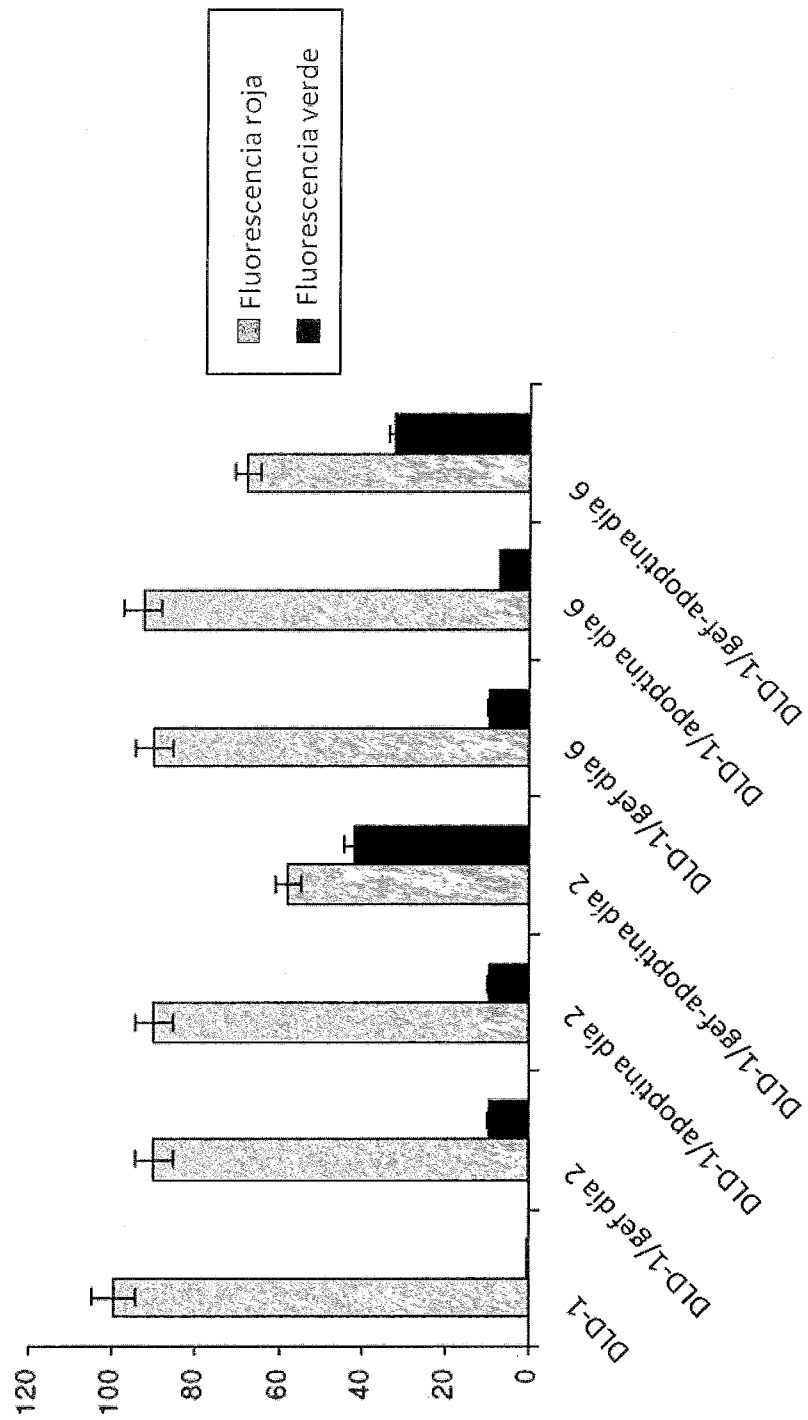


FIG. 4

5/5

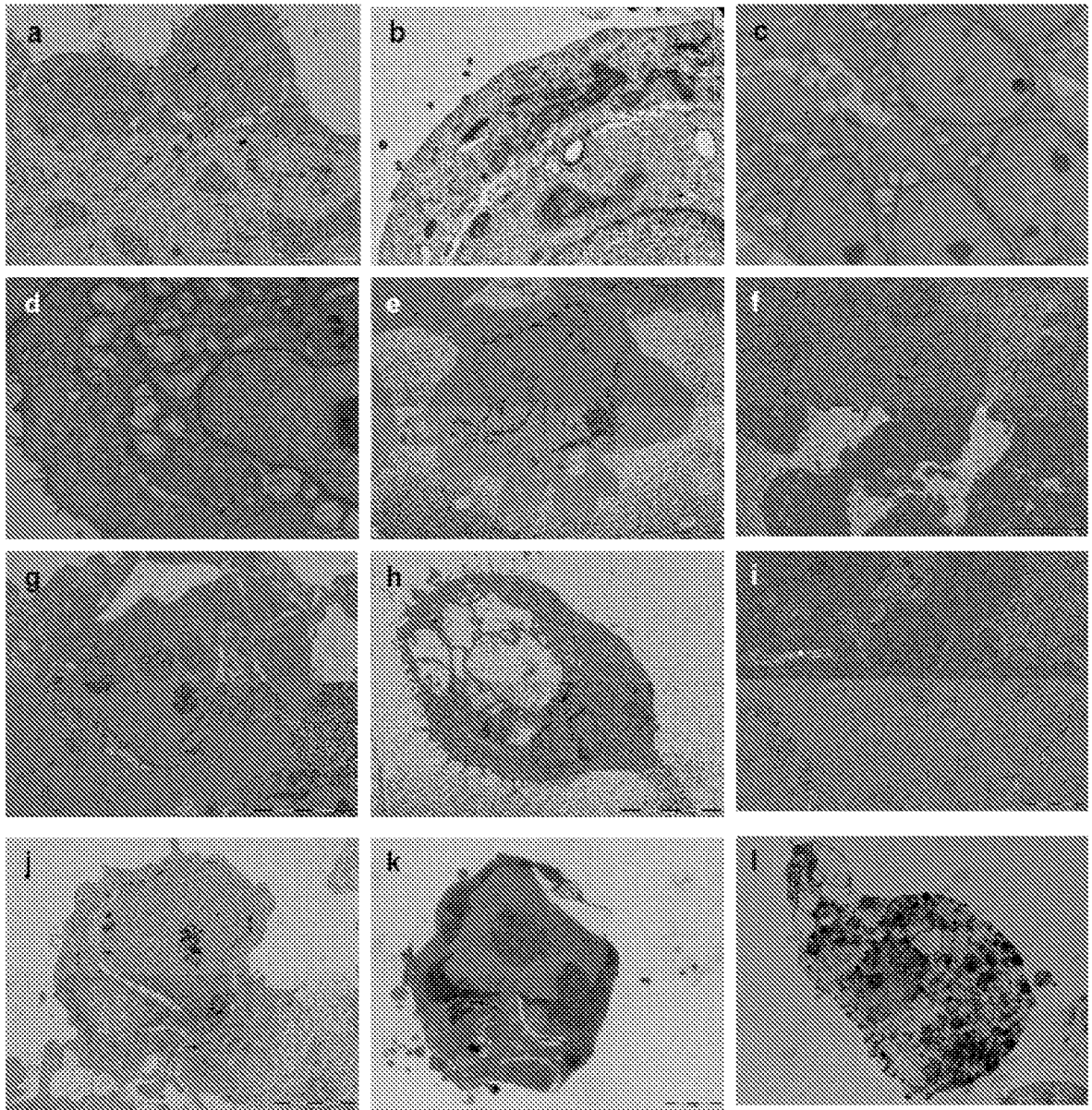


FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070606

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, GOOGLE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHOU, S. et al. "Mechanisms of Apoptin-induced cell death". MEDICAL ONCOLOGY. December 2012. Vol. 29, N° 4, pages 2985-2991, the whole document.	1-16
A	YAN, L. et al. "Construction, expression and characterization of dual cancer-specific fusion protein targeting carcinoembryonic antigen in intestinal carcinomas". January 2010. Vol. 69, N° 1, pages 120-125, the whole document.	1-16
A	ORTIZ, R. et al. "Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of cytotoxics in colon cancer cells". BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY. October 2012. Vol. 66, N° 7, pages 563-567, the whole document.	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21/10/2014

Date of mailing of the international search report
(23.10.2014)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
M. Novoa Sanjurjo

Telephone No. 91 3498466

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070606

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BOULAIZ, H. et al. "A novel doublé-enhanced suicide gene therapy in a colon cancer cell line mediated by Gef and Apoptin". BIODRUGS. February 2014. Vol. 28, N° 1, pages 63-74, the whole document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070606

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/47 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2014/070606

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07K, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, GOOGLE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ZHOU, S. et al. "Mechanisms of Apoptin-induced cell death". MEDICAL ONCOLOGY. Diciembre 2012. Vol. 29, Nº 4, páginas 2985-2991, todo el documento.	1-16
A	YAN, L. et al. "Construction, expression and characterization of dual cancer-specific fusion protein targeting carcinoembryonic antigen in intestinal carcinomas". Enero 2010. Vol. 69, Nº 1, páginas 120-125, todo el documento.	1-16
A	ORTIZ, R. et al. "Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of cytotoxics in colon cancer cells". BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY. Octubre 2012. Vol. 66, Nº 7, páginas 563-567, todo el documento.	1-16

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21/10/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
23 Octubre 2014 (23.10.2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Novoa Sanjurjo
Nº de teléfono 91 3498466

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070606

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

- 1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:
- a. Medios
- ☐ en papel
- ☒ en formato electrónico
- b. Cuando
- ☐ en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☒ junto con la solicitud internacional en formato electrónico
- ☐ posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070606

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	BOULAIZ, H. et al. "A novel double-enhanced suicide gene therapy in a colon cancer cell line mediated by Gef and Apoptin". BIODRUGS. Febrero 2014. Vol. 28, Nº 1, páginas 63-74, todo el documento.	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070606

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07K14/47 (2006.01)

A61K38/17 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)