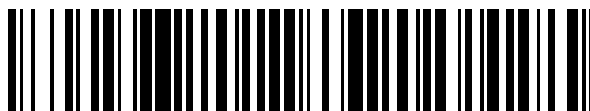


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 332**

51 Int. Cl.:

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2007 E 07870731 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 2043662**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

26.07.2006 US 820381 P

09.02.2007 US 889095 P

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

07.12.2015

73 Titular/es:

INTREXON CORPORATION (100.0%)

1750 Kraft Drive, Suite 1400

Blacksburg, VA 26060, US

72 Inventor/es:

REED, THOMAS D. y

BEECH, ROBERT P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 553 332 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a métodos *ex vivo* de obtención de composiciones que comprenden células vivas no enfermas adecuadas para tratar una enfermedad por destrucción de las células enfermas en un sujeto causando la expresión selectiva de un polipéptido letal en células en las que se expresa al menos un gen marcador de la enfermedad.

15 **Antecedentes de la invención**

El cáncer es un conjunto de enfermedades resultante del crecimiento celular incontrolado que causa dolor intratable y muerte en más de 300.000 personas por año solo en los Estados Unidos. Los oncogenes son genes que, hablando en términos generales, estimulan el crecimiento celular del cáncer. Se cree que el desarrollo del cáncer depende de la activación de oncogenes y la inactivación coincidente de genes supresores del crecimiento (Park, M., "Oncogenes" in *The Genetic Basis of Human Cancer* (B. Vogelstein *et al.*, eds.) pp. 205-228 (1998)). Los oncogenes son mutantes, formas dominantes de protooncogenes que estimulan la proliferación celular, mientras que los genes supresores de tumores son recesivos y normalmente inhiben la proliferación celular.

25 El tratamiento de pacientes del cáncer con agentes quimioterapéuticos sigue siendo el método principal de tratamiento de enfermedad sistémica y existe una asociación directa entre la intensidad de dosis quimioterapéutica y la tasa de respuesta clínica. Sin embargo, el aumento de la dosis de quimioterapia tiene efectos secundarios significativos incluyendo la destrucción extendida de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea con destrucción concomitante de las células linfoides y mieloides periféricas. A menudo se usa el trasplante de células madre junto con altas dosis de quimioterapia para facilitar la recuperación del sistema hematopoyético después de quimioterapia.

35 A menudo se usa trasplante alogénico de células madre, que es un trasplante de células madre de un donante distinto al paciente. Sin embargo, el protocolo de trasplante alogénico acarrea una alta tasa de mortalidad debido principalmente a la enfermedad de injerto contra hospedador (GVD), en la que las células trasplantadas atacan los propios tejidos del paciente.

40 El trasplante autólogo de células madre es un protocolo en el que las células madre del paciente se aíslan antes de la dosis elevada de quimioterapia y posteriormente se reinfunden. El trasplante autólogo evita las complicaciones asociadas a la GVD pero puede dar como resultado la reinfusión de células tumorales desde el producto de células madre. La reinfusión de células tumorales es importante debido a que los estudios de marcado de genes han demostrado que las células tumorales reinfundidas pueden contribuir directamente a una recaída de la enfermedad y a un mal resultado clínico. Por ejemplo, en los casos de linfoma, leucemia, cáncer de mama y neuroblastoma, al menos algunas de las células tumorales contaminantes en un protocolo de trasplante de células de sangre periférica tienen la capacidad de crecer clonogénicamente *in vitro* (Ross, *et al.*, *Blood* 82:2605-2610 (1993)) así como en el paciente.

50 Para evitar la reinfusión de las células del cáncer al paciente que experimenta un trasplante autólogo de células madre los médicos han intentado "purgar" las células de la médula ósea de las células tumorales contaminantes. Se han desarrollado diversas aproximaciones para el purgado *ex vivo* de células tumorales que contaminan las poblaciones de células madre. Por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales frente a antígenos de membrana con fármacos citotóxicos, toxinas, fototerapia y modificadores biológicos o fármacos citotóxicos pueden reducir la contaminación tumoral en 1 a 3 órdenes de magnitud (Seiden, *et al.*, *J. Infusional Chemotherapy* 6:17-22 (1996)). En otro protocolo se han usado anticuerpos que se dirigen hacia las células tumorales que se conjugan con radioisótopos en un intento de purgar las células tumorales. El uso de fármacos citotóxicos y/o radiactividad puede no ser específico ya que las células tumorales y las células progenitoras a menudo presentan un fenotipo similar de las proteínas de la superficie celular y el uso de tales técnicas puede retrasar el injerto. También se ha usado la selección de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ para reducir la reinfusión de células tumorales, aunque con una eficacia de purga mucho menor. De nuevo, estos métodos de selección basados en CD34 pueden no ser lo bastante específicos ya que las células tumorales a menudo presentan el antígeno CD34.

60 De este modo, existe la necesidad en la técnica de nuevos métodos que retiren específicamente células enfermas de una población de células que se fija como diana para trasplante autólogo.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos *ex vivo* de obtención de células vivas no enfermas, siendo dichas células adecuadas para tratar una enfermedad por destrucción de células enfermas en un sujeto. En una realización, los métodos comprenden determinar la actividad de al menos un gen marcador de enfermedad en una población de células obtenidas de un sujeto. A continuación se introduce en las células una molécula de polinucleótido que codifica un marcador seleccionable y un polipéptido letal, donde la expresión del polipéptido letal se controla mediante el promotor de al menos uno de los genes marcadores de enfermedad identificados previamente. Un péptido letal se define como un polipéptido que por sí mismo es letal para las células. Después de la introducción del polinucleótido, las células se exponen a condiciones de selección para obtener células que comprenden el polinucleótido y a continuación las células se tratan en condiciones que inducen la expresión del polipéptido letal para destruir las células que expresan el gen o genes marcadores de enfermedad. Después de la destrucción de las células enfermas, las células vivas restantes, que no expresaron el polipéptido letal en la extensión necesaria para eliminar las células, se separan de las células muertas. Las células vivas son adecuadas para restitución al sujeto.

En una realización de la invención, el polinucleótido introducido en las células se elimina antes de restituir las células al sujeto. En otra realización, el polinucleótido no se elimina de las células antes de la restitución de las células al sujeto. Esto permite la destrucción de las células restituidas *in vivo* en el caso de una reaparición de la enfermedad.

Otra realización de la invención se refiere a métodos de tratamiento individualizado de un sujeto con necesidad de tratamiento para una afección anómala, que comprende determinar la actividad de al menos un gen marcador de enfermedad en una población de células obtenidas del sujeto, aislar al menos un promotor del gen marcador de enfermedad, generar un polinucleótido terapéutico mediante unión directa o indirecta del promotor a un polinucleótido que codifica un polipéptido que es letal para dichas células y colocarlo en un vector que comprende además un marcador seleccionable. El polinucleótido terapéutico se introduce en las células y las células se exponen a condiciones de selección para obtener células que comprenden el polinucleótido y a continuación se tratan en condiciones que inducen la expresión del polipéptido letal, mediante lo cual se destruyen las células que expresan el gen marcador de enfermedad. Las células vivas no enfermas restantes son entonces adecuadas para la restitución al sujeto.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 representa un diagrama de flujo de trabajo de un proceso de tratamiento típico que usa los métodos de la presente invención. Los métodos representados en la Figura 1 comprenden integración genómica, selección y destrucción. Los constructos se pueden eliminar opcionalmente del genoma. La figura también enumera variaciones no limitantes de métodos que están dentro del alcance de la presente invención. Se puede combinar cualquier método de integración genómica (G1, G2 o G3) con cualquier método de selección (S1, S2 o S3) y destrucción celular (K1, K2, K3 o K4). Del mismo modo, también se puede elegir cualquier método de eliminación genómica (E1, E2 o E3), si los componentes que permitieran la eliminación se hallaran presentes en el genoma.

La FIGURA 2 representa una realización de los polinucleótidos terapéuticos de la presente invención. En la FIGURA 2, el programa génico PE3-1 es un gen selector/indicador de integración en el genoma. El programa génico PE3-2 es un promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión del polipéptido letal, por ejemplo, DTA. El programa génico PE3-3 es un promotor inducible, por ejemplo, TetO, que dirige la expresión de una recombinasa, por ejemplo, Cre. El programa génico PE3-4 es un promotor constitutivo que dirige la expresión de un ADNc inductor, por ejemplo, rTTA. Los programas génicos PE3-n son genes selectores/indicadores negativos que se pueden usar para mejorar la eficacia de fijación de diana. El símbolo de punta de flecha representa secuencias reguladoras *cis*, por ejemplo, loxP, que se reconocen por una enzima recombinasa, por ejemplo, Cre. Los círculos representan regiones en la secuencia de polinucleótido que pueden comprender un dominio de modificación de cromatina (CMD). GIS-1 y GIS-2 son sitios de integración genómica.

La FIGURA 3 representa otra realización de los polinucleótidos terapéuticos de la presente invención. En la FIGURA 3, el programa génico PE3-1 es un gen selector/indicador de integración de genoma. Los programas génicos PE3-2 y PE3-3 son cada uno un promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión de una de las dos mitades de un factor de transcripción Rheo. El programa génico PE3-4 es un promotor Rheo que dirige la expresión de un polipéptido letal, por ejemplo, DTA. El promotor Rheo requiere la presencia del factor de transcripción Rheo, que está comprendido por dos subunidades que se unen conjuntamente en presencia de un ligando. Cada una de las subunidades del factor de transcripción Rheo se expresa en los programas génicos PE3-2 y PE3-3, respectivamente. El programa génico PE3-5 es un promotor constitutivo que dirige la expresión de un ADNc inductor, por ejemplo, rTTA. El programa génico PE3-6 es un promotor inducible, por ejemplo, TetO, que dirige la expresión de una recombinasa, por ejemplo, Cre. Los programas génicos PE3-n son genes selectores/indicadores negativos que se pueden usar para mejorar la eficacia de fijación de diana. El símbolo de punta de flecha representa secuencias reguladoras *cis*, por ejemplo, loxP, que se reconocen por una enzima recombinasa, por ejemplo, Cre. Los círculos representan regiones en la secuencia de polinucleótido que pueden comprender un dominio de modificación de cromatina (CMD). GIS-1 y GIS-2 son sitios de integración genómica.

La FIGURA 4 representa otra realización de los polinucleótidos terapéuticos de la presente invención. En la FIGURA 4, el programa génico PE3-1 es un gen selector/indicador de integración de genoma. El programa

génico PE3-2 es un promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión de polipéptido letal, por ejemplo, DTA. El programa génico PE3-3 es un promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión de polipéptido letal. El promotor y el polipéptido letal pueden ser idénticos o diferentes del promotor y el polipéptido letal del programa génico PE3-2. El programa génico PE3-4 es un promotor constitutivo que dirige la expresión de un ADNc inductor, por ejemplo, rTTA. El programa génico PE3-5 es un promotor inducible, por ejemplo, TetO, que dirige la expresión de una recombinasa, por ejemplo, Cre. Los programas génicos PE3-n son genes selectores/indicadores negativos que se pueden usar para mejorar la eficacia de fijación de diana. El símbolo de punta de flecha representa secuencias reguladoras cis, por ejemplo, loxP, que se reconocen por una enzima recombinasa, por ejemplo, Cre. Los círculos representan regiones en la secuencia de polinucleótido que pueden comprender un dominio de modificación de cromatina (CMD). GIS-1 y GIS-2 son sitios de integración genómica.

La FIGURA 5 representa una realización de los polinucleótidos terapéuticos de la presente invención. En la FIGURA 5, el programa génico PE3-1 es un gen selector/indicador de integración de genoma. El programa génico PE3-2 es un promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión de polipéptido letal, por ejemplo, DTA. El programa génico PE3-3 es un promotor constitutivo que dirige la expresión de un ADNc inductor, por ejemplo, rTTA. El programa génico PE3-4 es un promotor inducible, por ejemplo, TetO, que dirige la expresión de una recombinasa, por ejemplo, Cre. El programa génico PE3-5 es un promotor constitutivo que dirige la expresión de factores que estimulan la desdiferenciación de células progenitoras. Los programas génicos PE3-n son genes selectores/indicadores negativos que se pueden usar para mejorar la eficacia de fijación de diana. El símbolo de punta de flecha representa secuencias reguladoras cis, por ejemplo, loxP, que se reconocen por una enzima recombinasa, por ejemplo, Cre. Los círculos representan regiones en la secuencia de polinucleótido que pueden comprender un dominio de modificación de cromatina (CMD). GIS-1 y GIS-2 son sitios de integración genómica.

La FIGURA 6 representa una realización de los polinucleótidos terapéuticos de la presente invención. En la FIGURA 6, el programa génico PE3-1 es el gen selector neo bajo el control de un promotor constitutivo. El programa génico PE3-2 es el promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión de un ADNc inductor, por ejemplo, rTTA. El programa génico PE3-3 es un promotor inducible, por ejemplo, TetO, que dirige la expresión del polipéptido letal, por ejemplo, DTA. Los círculos representan regiones en la secuencia de polinucleótido que pueden inducir la presencia de un Dominio de Modificación de Cromatina (CMD).

La FIGURA 7 representa una realización de los polinucleótidos terapéuticos de la presente invención. En la FIGURA 7, el programa génico PE3-1 es un selector de integración de genoma, por ejemplo, neo, dirigido por un promotor específico de célula progenitora. El programa génico PE3-2 es un promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión de un ADNc inductor, por ejemplo, rTTA. El programa génico PE3-3 es un promotor inducible, por ejemplo, TetO, que dirige la expresión de un gen destructor, por ejemplo, DTA. El programa génico PE3-4 es un promotor constitutivo que dirige la expresión de un segundo ADNc inductor, por ejemplo, RheoCept[®]. El programa génico PE3-5 es un promotor inducible, por ejemplo, RheoSwitch[®], que dirige la expresión de una recombinasa, por ejemplo, Cre, para suprimir el constructo. Los símbolos de punta de flecha representan una secuencia reguladoras cis reconocida por una enzima recombinasa, por ejemplo, el sitio de loxP. Los círculos representan una región en la secuencia de polinucleótido que puede inducir la presencia de un Dominio de Modificación de Cromatina (CMD).

La FIGURA 8 representa una realización de los polinucleótidos terapéuticos de la presente invención. En la FIGURA 8, el programa génico PE3-1 es un gen selector de integración de genoma dirigido por un promotor de célula madre. El programa génico PE3-2 es un promotor de gen marcador de enfermedad que dirige la expresión de un ADNc inductor, por ejemplo, rTTA. El programa génico PE3-3 es un promotor inducible, por ejemplo, TetO, que dirige un sustrato basado en enzima para la conversión letal de un gen destructor, por ejemplo, timidina quinasa. Los programas génicos PE3-n son genes selectores negativos, por ejemplo, un promotor constitutivo que dirige la expresión de citosina desaminasa (CDA) o difteria (DTA) para mejorar la eficacia de fijación de diana. Los círculos representan una región en la secuencia de polinucleótido que puede inducir la presencia de un Dominio de Modificación de Cromatina (CMD). GIS-1 y GIS-2 son sitios de integración genómica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a métodos *ex vivo* de obtención de células vivas no enfermas adecuadas para tratar una enfermedad por destrucción de células enfermas en un sujeto. Los métodos comprenden determinar la actividad de al menos un gen marcador de enfermedad en una población de células obtenidas de un sujeto. A continuación, se introduce en las células una molécula de polinucleótido que codifica un polipéptido que es letal para las células, donde la expresión del polipéptido letal se controla por el promotor de al menos uno de los genes marcadores de enfermedad identificados previamente. Después de la introducción del polinucleótido, las células se tratan en condiciones que inducen la expresión del polipéptido letal para destruir las células que expresan el gen o genes marcadores de enfermedad. Después de la destrucción de las células enfermas, las células vivas restantes, que no expresaron el polipéptido letal en la extensión necesaria para destruir las células, se separan de las células muertas. Las células vivas son entonces adecuadas para la restitución al sujeto.

En una realización de la invención, el polinucleótido introducido en las células se elimina antes de la restitución de las células al sujeto. En otra realización, el polinucleótido no se elimina de las células antes de la restitución de las células al sujeto. Esto permite la destrucción de las células reintroducidas *in vivo* en el caso de una reaparición de la

enfermedad.

Como se usa en el presente documento, una "célula enferma" se usa para indicar una célula o células que son anormales en su metabolismo, histología, velocidad de crecimiento, velocidad mitótica o fenotipo. Como se usa en el presente documento, el término "fenotipo" se usa con respecto a las células para indicar la colección de proteínas que expresa normalmente una célula de un tejido u órgano particular. Por ejemplo, los fenotipos de células aisladas individuales se pueden evaluar o clasificar basándose en la presencia o ausencia de marcadores de superficie celular tales como cúmulos de diferenciación (factores CD), que son antígenos de superficie celular. Aunque se considera generalmente que el fenotipo de las células es la colección de proteínas que la célula expresa o contiene, únicamente puede ser necesario determinar la presencia o ausencia de una proteína individual para clasificar adecuadamente una célula en una población o subpoblación dada o evaluar su fenotipo. Por ello, como se usa en el presente documento, el término "fenotipo" se usa para connotar una población o subpoblación particular a la que pertenece la célula, basándose en la presencia o ausencia de al menos una proteína o parte de la misma. Por ejemplo, realizaciones particulares de la presente invención comprenden células de aislamiento CD34⁺ que se encuentran normalmente en sangre periférica y médula ósea. Continuando el ejemplo, el fenotipo de una población o subpoblación dada de células aisladas se puede indicar simplemente como CD34 positivo (CD34⁺) o CD34 negativo (CD34⁻). Por supuesto, los métodos de la presente invención también contemplan determinar la presencia o ausencia de más de una proteína para clasificar una célula en una población o subpoblación dada de células. Algunos ejemplos de proteínas CD que se pueden usar para clasificar fenotipos de células incluyen pero no se limitan a, CD3, CD38, CD59, CD49, CD54, CD61 (receptor de vitronectina), CD71, CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD117, CD133, CD144 y CD166. También se pueden usar otras proteínas para determinar el fenotipo de una célula o población de células dada. Algunos ejemplos de otras proteínas que se pueden usar para clasificar el fenotipo de una célula incluyen pero no se limitan a, factores de transcripción tales como OCT4, cdx2 y Sox2, proteínas transportadoras tales como transportador ABC placentario (ABC-p) y otros antígenos de superficie celular tales como antígenos asociados a queratina sulfato, TRA-1-60, TRA-1-81, Thy-1 y los antígenos embrionarios específicos de etapa (SSEA), por ejemplo, SSEA-1, SSEA-2, SSEA-3 y SSEA-4. Otros ejemplos más de proteínas que se pueden usar para clasificar el fenotipo celular incluyen receptores de factores de crecimiento tales como receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor alfa transformante del crecimiento (TGF α), factor beta transformante del crecimiento (TGF β), activina IIa y proteína morfogénica ósea (BMP), así como las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), es decir, las proteínas MHC de clase I y de clase II. Aún más ejemplos de marcadores que se pueden usar para identificar fenotipos celulares son CK (citoqueratina) 9, CK19, pdx-1, nestina, Pax-6, Nkx2.2, neurofilamento, Tau, enolasa específica de neurona (NSE), proteínas de neurofilamento (NF), proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2), MAP2 quinasa, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y nucleótido cíclico fosfodiesterasa. Además, también es posible detectar la presencia o ausencia de partes o dominios de proteínas y no de la proteína entera, para evaluar o clasificar el fenotipo de una célula. Por ejemplo, algunas proteínas pueden contener dominio de homología src (SH), tales como SH1, SH2, SH3, SH4, etc., la presencia o ausencia del cual puede ser suficiente para evaluar o clasificar adecuadamente el fenotipo de una célula, por ejemplo, SH2⁺ o SH2⁻. Como se ha discutido anteriormente, el fenotipo de las células también se puede evaluar o clasificar por la ausencia de proteínas particulares.

Algunos métodos de identificación de fenotipos celulares incluyen pero no se limitan a, técnicas de inmunohistoquímica convencionales que usan anticuerpos específicos de antígeno, tales como, por ejemplo, anticuerpos anti-CD34. Otros métodos de evaluación o clasificación del fenotipo de una célula incluyen pero no se limitan a, técnicas de transferencia convencionales tales como transferencia de Western y transferencia de Northern y técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR). En realidad, debería ser evidente que se pueden usar métodos indirectos, tales como ensayos de medición o determinación de ARNm, por ejemplo, RT-PCR, para evaluar o clasificar el fenotipo de la célula. Otros métodos más de evaluación o clasificación de fenotipos de las células incluyen técnicas de micromatriz y técnicas de citometría de flujo. Algunos ejemplos de técnicas de citometría de flujo útiles para clasificar células basándose en su fenotipo se desvelan en Practical Flow Cytometry, 3ª edición, Wiley-Liss, Inc. (1995).

Una célula enferma puede tener, por ejemplo, un fenotipo anormal en comparación con las demás células tomadas de la misma fuente o tejido. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas expresan normalmente CD34 y CD59 pero no expresan CD4, que se expresa normalmente por los timocitos, linfocitos T auxiliares, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas o granulocitos. Cualquier célula madre hematopoyética que exprese CD34, CD59 y CD4 se puede considerar de este modo que, para los fines de la presente invención, tiene un fenotipo anormal, es decir, la célula está enferma. En una realización, las células comprenden células madre hematopoyéticas, donde al menos una parte de las células madre hematopoyéticas son células enfermas.

Otros ejemplos de células madre incluyen pero no se limitan a, células madre hepáticas, células madre mamarias, células madre pancreáticas, células madre neuronales, células madre mesenquimales y células madre embrionarias no humanas. Las células madre pueden ser o no ser pluripotentes. Las "células pluripotentes" incluyen células y su progenie, que pueden ser capaces de diferenciarse en, o dar lugar a, células pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes. Las "células multipotentes" incluyen células y su progenie, que son capaces de diferenciarse en, o dar lugar a, células progenitoras multipotentes, oligopotentes y unipotentes y/o uno o más tipos de células maduras o parcialmente maduras, excepto en que los tipos de células maduras o parcialmente maduras

derivadas de células multipotentes están limitadas a células de un tejido, órgano o sistema de órganos particular. Como se usa en el presente documento, "células parcialmente maduras" son células que exhiben al menos una característica del fenotipo, tal como morfología o expresión de proteínas, de una célula madura del mismo órgano o tejido. Por ejemplo, una célula progenitora hematopoyética multipotente y/o su progenie poseen la capacidad de diferenciarse en o dar lugar a uno o más tipos de células oligopotentes, tales como células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides y también dar lugar a otros componentes celulares maduros encontrados normalmente en la sangre. Las "células oligopotentes" incluyen células y su progenie, cuya capacidad para diferenciarse en células maduras o parcialmente maduras es más restringida que las células multipotentes. Sin embargo, las células oligopotentes aún pueden poseer la capacidad de diferenciarse en células oligopotentes y unipotentes y/o uno o más tipos de células maduras o parcialmente maduras de un tejido, órgano o sistema de órganos dado. Un ejemplo de una célula oligopotente es una célula progenitora mieloides, que finalmente puede dar lugar a eritrocitos, plaquetas, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos maduros o parcialmente maduros. Las "células unipotentes" incluyen células y su progenie que poseen la capacidad de diferenciarse en o dar lugar a otras células unipotentes y/o un tipo de célula madura o parcialmente madura. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula progenitora" se usa para indicar células y su progenie que se pueden diferenciar en células al menos parcialmente maduras pero carecen de la capacidad de autorrenovación indefinida en cultivo. Las células progenitoras, como se usa en el presente documento, pueden ser pluripotentes, multipotentes, oligopotentes o incluso unipotentes.

Los métodos de la presente invención se llevan a cabo en una población de células obtenidas de un sujeto con necesidad de tratamiento. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se usa de forma intercambiable con el término "paciente" y se usa para indicar un animal, en particular un mamífero, e incluso más particularmente un primate no humano o humano.

Como se usa en el presente documento, cuando se usa con respecto a células, el término "obtener" se pretende que indique cualquier proceso de retirada de células de un sujeto. Las células no necesitan aislarse o purificarse cuando se obtienen de un sujeto. Las células se pueden obtener a partir de cualquier fluido corporal de un sujeto (por ejemplo, sangre, suero, orina, saliva, fluido cerebroespinal) o a partir de muestras de tejido de un sujeto (por ejemplo, biopsias, aspirados de médula ósea). Una vez obtenidas, las células deseadas se pueden aislar a continuación.

Como se usa en el presente documento, los términos "aislado" o "aislar" o las variantes de los mismos, cuando se usan con respecto a una célula o población de células, significan que la célula o población de células se han separado de la mayoría de las moléculas y/o materiales circundantes presentes que rodean la célula o células cuando la célula o células están asociados a un sistema biológico (por ejemplo, médula ósea). La concentración de materiales tales como agua, sales y tampón no se considera cuando se determina si una célula ha sido "aislada". De este modo, no se pretende que el término "aislado" implique o indique una población purificada de células de un fenotipo particular, ni se pretende que indique una población de células completamente desprovista de residuos, células no viables o células de un fenotipo diferente. Los métodos de aislamiento de células no deberían limitar el alcance de la invención descrita en el presente documento. Por ejemplo, las células se pueden aislar usando métodos bien conocidos, tales como citometría de flujo u otros métodos que exploten el fenotipo de una célula. Algunos métodos adicionales de aislamiento de células incluyen usar selectores positivos o negativos que los constructos terapéuticos pueden contener, de modo que las células se puedan aislar antes o después de introducir el polinucleótido terapéutico en las células. De este modo, en una realización, el constructo puede comprender un selector positivo que se puede usar para "aislar" las células deseadas de otras células que se obtienen inicialmente.

Como se usa en el presente documento, el término "purificado", cuando se usa con respecto a una célula o población de células, significa que la célula o células han sido separadas de básicamente todos los materiales que rodean normalmente la célula o células cuando la célula o células están asociadas a un sistema biológico. De este modo, "purificado" es un término relativo que se basa en un cambio de condiciones en términos de células y/o materiales en proximidad cercana con las células aisladas que se purifican. De este modo, las células hematopoyéticas aisladas se considera que están purificadas incluso si se retiran al menos algunos residuos celulares, células no viables, células de un fenotipo diferente o células o moléculas tales como proteínas y/o carbohidratos por lavado o procesamiento adicional, después del aislamiento. El término purificado no se usa para indicar que se retira la totalidad de la materia destinada a retirarse de las células que se purifican. De este modo, puede estar presente cierta cantidad de contaminantes junto con las células purificadas.

En una realización, la actividad de al menos un gen marcador de enfermedad se determina después de que se obtengan las células. En otra realización, la actividad de al menos un gen marcador de enfermedad se determina antes de que se obtengan las células. De este modo, se puede suponer o inferir la actividad de uno o más genes marcadores de enfermedad si la enfermedad o afección anormal del sujeto exhibe los síntomas o marcadores habituales de las enfermedades o afecciones anormales donde se ha establecido la actividad de un conjunto de genes marcadores de enfermedad. Como se usa en el presente documento, se pretende que un gen marcador de enfermedad indique un gen cuyos niveles de expresión se pueda usar para evaluar, diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de una enfermedad o afección anormal. Los genes marcadores de enfermedad incluyen genes que se expresan únicamente en células enfermas y genes que se expresan en células normales pero se expresan a niveles elevados en células enfermas. La mayoría de los ejemplos bien conocidos de genes marcadores de enfermedad son oncogenes pero, sin embargo, los métodos de la presente invención no se limitan a oncogenes. Algunos ejemplos

de clases de oncogenes incluyen pero no se limitan a, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, proteína quinasas, reguladores de muerte celular programada y factores de transcripción. Algunos ejemplos específicos de oncogenes incluyen pero no se limitan a, sis, erb B, erb B-2, ras, abl, myc y bcl-2 y TERT. Algunos ejemplos de otros genes marcadores de enfermedad incluyen genes de antígenos asociados a tumores y otros genes que se sobreexpresan en células enfermas (por ejemplo, MAGE-1, antígeno carcinoembrionario, tirosinasa, antígeno prostático específico, antígeno de membrana prostático específico, p53, MUC-1, MUC-2, MUC-4, HER-2/neu, T/Tn, MART-1, gp100, GM2, Tn, sTn y antígeno de Thompson-Friedenreich (TF)).

Una vez se han determinado los genes marcadores de enfermedad, se colocan los promotores de estos genes marcadores de enfermedad en un polinucleótido terapéutico. Como se usa en el presente documento, el término polinucleótido terapéutico se usa para indicar un polinucleótido que se introduce en la población de células con el fin de destruir las células enfermas. En una realización, el promotor se inserta en el polinucleótido de modo que se una de forma operable a una parte del polinucleótido que codifica un polipéptido que es letal para las células. Por lo tanto, los métodos explotan la actividad anormal de la célula enferma de modo que la célula enferma se destruya finalmente a sí misma. Como se usa en el presente documento, la expresión "unido de forma operable" significa una unión funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o una matriz de sitios de unión de factores de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia. En otra realización, el promotor se une indirectamente a la expresión del polipéptido letal. Por ejemplo, el promotor de marcador de enfermedad se puede unir de forma operable a un factor de transcripción que activa un segundo promotor que se une de forma operable al polinucleótido que codifica el polipéptido letal.

El término "promotor" se usa en el presente documento tal como es en la técnica. En concreto, el término promotor se refiere a una región de ADN que permite la unión de una ARN polimerasa para iniciar la transcripción de una secuencia genética. La secuencia de numerosos genes marcadores de enfermedad, incluyendo la región del promotor, se conoce en la técnica y está disponible en bases de datos públicas, por ejemplo, GenBank. Por ello, una vez se identifica un gen marcador de enfermedad en las células obtenidas o aisladas, la secuencia del promotor se puede identificar y obtener fácilmente. Otro aspecto de la presente invención se refiere a la identificación de un gen marcador de enfermedad cuyo promotor se puede aislar y colocar en un polinucleótido terapéutico. Por lo tanto, la identidad del gen marcador de enfermedad puede no ser crítica en realizaciones específicas de la presente invención, siempre que el promotor se pueda aislar y usar en las configuraciones y entornos posteriores. La presente invención incluye de este modo el uso de promotores de genes marcadores de enfermedad que aún se tienen que identificar. Una vez se identifican nuevos genes marcadores de enfermedad, puede ser cuestión de habilidad rutinaria o experimentación determinar las secuencias genéticas necesarias para la función del promotor. De hecho, existen varios protocolos comerciales para ayudar en la determinación de la región promotora de los genes de interés. A modo de ejemplo, Ding *et al.* dilucidaron recientemente la secuencia del promotor del nuevo gen *Sprouty4* (Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 287: L52-L59 (2004)) por supresión progresiva de la secuencia 5'-flanqueante del gen *Sprouty4* humano. En resumen, una vez se determinó el sitio de iniciación de transcripción, se generaron fragmentos de PCR usando cebadores de PCR comunes para clonar segmentos del segmento 5'-flanqueante de forma unidireccional. Los segmentos generados se clonaron en un vector indicador de luciferasa y se midió la actividad de luciferasa para determinar la región del promotor del gen *Sprouty4* humano.

Otro ejemplo de un protocolo para adquirir y validar promotores de genes marcadores de enfermedad incluye las siguientes etapas: (1) adquirir muestras de células/tejidos cancerosos y no cancerosos de un tipo de tejido similar/igual; (2) aislar ARN total o ARNm de las muestras; (3) llevar a cabo un análisis de micromatriz diferencial del ARN canceroso y no canceroso; (4) identificar transcritos candidatos específicos del cáncer; (5) identificar secuencias genómicas asociadas con los transcritos específicos del cáncer; (6) adquirir o sintetizar una secuencia de ADN corriente arriba y corriente abajo del sitio de inicio de transcripción predicho de los transcritos específicos del cáncer; (7) diseñar y producir vectores indicadores de promotor usando diferentes longitudes de ADN de la etapa 6; y (8) ensayar los vectores indicadores de promotor en células/tejidos cancerosos y no cancerosos, así como en células/tejidos no relacionados.

La fuente del promotor que se inserta en el polinucleótido terapéutico puede ser natural o sintética y la fuente del promotor no debería limitar el alcance de la invención descrita en el presente documento. En otras palabras, el promotor se puede clonar directamente a partir de células obtenidas o aisladas, o el promotor se puede haber clonado previamente a partir de una fuente diferente, o el promotor se puede haber sintetizado.

En una realización, el promotor se une de forma operable a un polinucleótido que codifica un polipéptido que, cuando se expresa, es letal para la célula que expresa el polipéptido, debido a que el propio polipéptido es letal. Como se usa en el presente documento, un polipéptido que es letal para células también incluye polipéptidos que inducen la muerte celular de cualquier forma, incluyendo pero sin limitarse a, necrosis, apoptosis y citotoxicidad. Algunos ejemplos de polipéptidos que pueden ser letales para células incluyen pero no se limitan a, genes supresores de tumores que inducen apoptosis tales como pero no limitados a, p53, Rb y BRCA-1, toxinas tales como la toxina de la difteria (DTA), neurotoxina de Shigella, toxina del botulismo, toxina del tétanos, toxina del cólera, CSE-V2 y otras variantes de toxinas de proteínas de escorpión por nombrar algunas, genes suicidas tales como citosina desaminasa y timidina quinasa y genes citotóxicos, por ejemplo, factor de necrosis tumoral, interferón-alfa. La

presente invención no está limitada por la identidad de la proteína letal, siempre que la proteína sea capaz de ser letal para la célula en la que se expresa.

En otra realización, el promotor de gen marcador de enfermedad se une indirectamente a la expresión del polipéptido letal. En una realización, el promotor de gen marcador de enfermedad se une de forma operable a un polinucleótido que codifica un factor de transcripción y el polinucleótido que codifica el polipéptido letal se une de forma operable a un promotor que se activa por el factor de transcripción. El factor de transcripción puede ser un factor de transcripción dependiente de ligando que activa la transcripción únicamente en presencia de ligando, por ejemplo, miembros de la superfamilia de receptores esteroides activados por sus respectivos ligandos (por ejemplo, glucocorticoide, estrógeno, progestina, retinoide, ecdisona y análogos y miméticos de los mismos) o rTTA activado por tetraciclina. El factor de transcripción puede ser un polipéptido de origen natural o un polipéptido quimérico que comprende dominios de dos o más factores de transcripción diferentes. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando, el dominio de transactivación y el dominio de unión a ADN se pueden obtener cada uno a partir de dos o tres factores de transcripción diferentes. En una realización, el factor de transcripción es uno que está regulado estrictamente por el nivel de ligando que está presente. En otra realización, los dominios del factor de transcripción se pueden expresar en polipéptidos separados de modo que la activación de la transcripción se produzca solo cuando los dos polipéptidos se dimericen conjuntamente (y el ligando esté presente). Un ejemplo de tal sistema es los sistemas de receptor de ecdisona quimérico descritos en el documento de Patente de Estados Unidos N° 7,091,038, los documentos de Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos con números 2002/0110861, 2002/0119521, 2004/0033600, 2004/0096942, 2005/0266457 y 2006/0100416 y los documentos de Solicitud Publicada Internacional con números WO 01/70816, WO 02/066612, WO 02/066613, WO 02/066614, WO 02/066615, WO 02/29075 y WO 2005/108617. Un ejemplo de un sistema regulado por agonista de ecdisona no esteroideo es el Sistema de Expresión Inducible de Mamífero RheoSwitch® (New England Biolabs, Ipswich, MA).

Para introducir el polinucleótido terapéutico en las células, se puede usar un vector que comprende el promotor elegido y el polinucleótido que codifica el polipéptido letal. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de plásmido, un vector de fago mono o bicatenario, o un vector viral de ARN o ADN mono o bicatenario. Tales vectores se pueden introducir en las células mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en las células. Los vectores virales pueden ser con capacidad de replicación o sin capacidad de replicación. En el último caso, la propagación viral se produce generalmente solo en células hospedadoras complementarias. Como se usa en el presente documento, la expresión "células hospedadoras" o el término "hospedador" se usan para indicar una célula de la presente invención que aloja uno o más polinucleótidos terapéuticos.

De este modo, como mínimo, los vectores deben incluir un promotor de un gen marcador de enfermedad y un polinucleótido que codifica un polipéptido letal. Otros componentes del vector pueden incluir pero no se limitan a, marcadores seleccionables, dominios de modificación de cromatina, promotores adicionales que dirigen la expresión de otros polipéptidos que también pueden estar presentes en el vector, sitios de integración genómica, sitios de recombinación y pivotes de inserción molecular. Los vectores pueden comprender cualquier número de estos elementos adicionales de modo que el constructo se pueda adaptar a los objetivos específicos de los métodos de tratamiento deseados.

En una realización de la presente invención, los vectores que se introducen en las células comprenden además un "gen marcador seleccionable" que, cuando se expresa, indica que el constructo terapéutico de la presente invención se ha integrado en el genoma de la célula hospedadora. De esta manera, el gen selector puede ser un marcador positivo para la integración del genoma. Aunque no es crítico para los métodos de la presente invención, la presencia de un gen marcador seleccionable permite al médico seleccionar una población de células vivas donde el constructo del vector se ha integrado en el genoma de las células. Como se usa en el presente documento, el término "seleccionar" o las variantes del mismo, cuando se usa junto con células, pretende indicar métodos convencionales bien conocidos para elegir células con una constitución genética o fenotipo específicos. Algunos métodos habituales incluyen pero no se limitan a, cultivar células en presencia de antibióticos, tales como G418, neomicina y ampicilina. Otros ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen pero no se limitan a, genes que confieren resistencia a dihidrofolato reductasa, higromicina, o ácido micofenólico. Otros métodos de selección incluyen pero no se limitan a, un gen marcador seleccionable que permite el uso de timidina quinasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa como agentes de selección. Las células que comprenden un constructo de vector que comprende un gen o genes de resistencia a antibióticos deberían ser entonces capaces de tolerar el antibiótico en cultivo. Del mismo modo, las células que no comprenden un constructo de vector que comprende un gen o genes de resistencia a antibióticos no serían capaces de tolerar el antibiótico en cultivo.

Como se usa en el presente documento, un "dominio de modificación de cromatina" (CMD) se refiere a secuencias de nucleótidos que interactúan con diversas proteínas asociadas al mantenimiento y/o la alteración de la estructura de la cromatina, tales como pero no limitadas a, aislantes de ADN. Véase Ciavatta, D., *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A., 103(26):9958-9963 (2006). Algunos ejemplos de CMD incluyen pero no se limitan a, el aislante de globulina β de gallina y el sitio 4 hipersensible de gallina (CHS4). El uso de diferentes secuencias de CMD entre uno o más programas génicos puede facilitar, por ejemplo, el uso de secuencias de ADN de CMD diferenciales como "minibrazos de homología" en combinación con diversos microorganismos o tecnologías de ingeniería recombinante

in vitro para "intercambiar" programas génicos entre vectores lanzadera multigénicos o monogénicos existentes. Otros ejemplos de dominios de modificación de cromatina se conocen en la técnica o se pueden identificar fácilmente.

5 Los vectores particulares para su uso con la presente invención son vectores de expresión que codifican proteínas o partes de las mismas. Generalmente, tales vectores comprenden regiones de control de acción *cis* eficaces para la expresión en un hospedador unidas de forma operativa al polinucleótido que se va a expresar. Los factores de actuación *trans* adecuados se suministran por el hospedador, se suministran por un vector complementario o se suministran por el propio vector tras introducción en el hospedador.

10 Se pueden usar una gran diversidad de vectores de expresión para expresar proteínas. Tales vectores incluyen vectores cromosómicos, episomales y derivados del virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de episomas de levadura, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como virus adeno-asociados, lentivirus, baculovirus, papovavirus, tales como SV40, vaccinia virus, adenovirus, virus de la viruela aviaria, virus de la pseudorrabia y retrovirus y vectores derivados de las combinaciones de los mismos, tales como los derivados de plásmido y elementos genéticos de bacteriófago, tales como cósmidos y fagémidos. Todos se pueden usar para expresión de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Generalmente, cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos o proteínas en un hospedador se puede usar para expresión a este respecto.

20 La secuencia de ADN del vector de expresión se une de forma operativa a la secuencia o secuencias de control de expresión apropiadas que incluyen, por ejemplo, un promotor para dirigir la transcripción del ARNm. Algunos casos representativos de promotores adicionales incluyen pero no se limitan a, promotores constitutivos y específicos de tejidos o promotores inducibles. Algunos ejemplos de promotores constitutivos de eucariotas incluyen pero no se limitan a, el promotor del gen de metalotioneína I de ratón (Hamer *et al.*, J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288 (1982)); el promotor TK de herpesvirus (McKnight, Cell 31:355-365 (1982)); el promotor temprano SV40 (Benoist, *et al.*, Nature (Londres) 290:304-310 (1981)); y el promotor de vaccinia virus. Algunos ejemplos adicionales de los promotores que se podrían usar para dirigir la expresión de una proteína incluyen pero no se limitan a, promotores específicos de tejido y otros promotores endógenos para proteínas específicas, tales como el promotor de albúmina (hepatocitos), un promotor de proinsulina (células beta pancreáticas) y similares. En general, los constructos de expresión contendrán sitios para transcripción, iniciación y terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos puede incluir una iniciación de traducción AUG al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) ubicado apropiadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

35 Además, los constructos pueden contener regiones de control que regulen, así como engendren, la expresión. Generalmente, tales regiones operarán mediante el control de la transcripción, tales como sitios y potenciadores de unión de represores, entre otros.

40 El vector que contiene una secuencia de nucleótidos apropiada, así como un promotor apropiado y otras secuencias de control apropiadas, se pueden introducir en una célula de la presente invención usando diversas técnicas bien conocidas que son adecuadas para la expresión de un polipéptido deseado.

45 Algunos ejemplos de vectores eucarióticos incluyen pero no se limitan a, pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Amersham Pharmacia Biotech; y pCMVDsRed2-express, pIRES2-DsRed2, pDsRed2-Mito, pCMV-EGFP disponibles en Clontech. Otros muchos vectores son bien conocidos y están disponibles en el mercado.

50 Algunos vectores particularmente útiles, que comprende pivotes de inserción molecular para la inserción y retirada rápida de elementos de programas génicos, se describen en el documento de Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos Nº 2004/0185556, el documento de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 11/233,246 y los documentos de Solicitud Publicada Internacional con números WO 2005/040336 y WO 2005/116231. Un ejemplo de tales vectores es el Sistema de Producción UltraVector™ (Intrexon Corp., Blacksburg, VA). Como se usa en el presente documento, un "programa génico" es una combinación de elementos genéticos que comprende un promotor (P), una secuencia de expresión (E) y una secuencia reguladora 3' (3), de modo que "PE3" que se representa en las figuras es un programa génico. Los elementos del programa génico se pueden intercambiar fácilmente entre los pivotes moleculares que flanquean cada uno de los elementos del programa génico. Un pivote molecular, como se usa en el presente documento, se define como un polinucleótido que comprende al menos dos sitios de restricción raros o poco comunes no variables dispuestos de forma lineal. En una realización, el pivote molecular comprende al menos tres sitios de restricción raros o poco comunes no variables dispuestos de forma lineal. Por lo general, un pivote molecular cualquiera no incluiría un sitio de restricción raro o poco frecuente de cualquier otro pivote molecular del mismo programa génico. Las secuencias cognadas de más de 6 nucleótidos tras las cuales actúa una enzima de restricción dada se denominan sitios de restricción "raros". Sin embargo, existen sitios de restricción de 6 pb que se producen más infrecuentemente de lo que se predeciría estadísticamente y estos sitios y las endonucleasas de los escinden se denominan sitios de restricción "poco comunes". Algunos ejemplos de enzimas de restricción raras o poco comunes incluyen pero no se limitan a, AsiS I, Pac I, Sbf I, Fse I, Asc I, Mlu I,

SnaB I, Not I, Sal I, Swa I, Rsr II, BSIW I, Sfo I, Sgr AI, AflIII, Pvu I, Ngo MIV, Ase I, Flp I, Pme I, Sda I, Sgf I, Srf I y Sse8781 I.

5 El vector también puede comprender sitios de restricción para una segunda clase de enzimas de restricción denominadas enzimas endonucleasas *homing* (HE). Las enzimas HE tienen sitios de restricción asimétricos grandes (12-40 pares de bases) y sus sitios de restricción son infrecuentes en la naturaleza. Por ejemplo, la HE conocida como I-SceI tiene un sitio de restricción de 18 pb (5TAGGGATAACAGGGTAAT3' (SEC ID N°: 1)), predicho que se produzca únicamente una vez cada 7×10^{10} pares de bases de secuencia aleatoria. Esta tasa de aparición es equivalente a solo un sitio en un genoma que es 20 veces el tamaño de un genoma de mamífero. La naturaleza rara de los sitios HE aumenta enormemente la probabilidad de que un ingeniero genético pueda cortar un programa génico sin alterar la integridad del programa génico si se incluyeron sitios HE en las ubicaciones apropiadas en un plásmido de vector de clonación.

15 La selección de vectores y promotores apropiados para la expresión en una célula hospedadora es un procedimiento bien conocido y las técnicas requeridas para la construcción e introducción del vector en el hospedador, así como su expresión en el hospedador, son habilidades rutinarias en la técnica.

20 La introducción del constructo en las células puede ser una transfección transitoria, transfección estable o puede ser una inserción específica de lugar del vector. La transfección transitoria y estable de los vectores en la célula hospedadora se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Tales métodos se describen en numerosos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986); Keown *et al.*, 1990, Methods Enzymol. 185: 527-37; Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Estos métodos de transfección estable dan como resultado la inserción aleatoria del vector en el genoma de la célula. Además, el número de copias y la orientación de los vectores también son, hablando en términos generales, aleatorios.

30 En una realización de la invención, el vector se inserta en un sitio bioneutro del genoma. Un sitio bioneutro es un sitio del genoma donde la inserción del constructo interfiere muy poco, si lo hiciera, con la función normal de la célula. Los sitios bioneutros se pueden analizar usando bioinformática disponible. Se conocen numerosos sitios bioneutros en la técnica, por ejemplo, el lugar equivalente ROSA. Se pueden identificar otros sitios bioneutros usando técnicas de rutina bien conocidas en la técnica. La caracterización del sitio o sitios de inserción genómica se lleva a cabo usando métodos conocidos en la técnica. Para controlar la ubicación, número de copias y/u orientación del constructo cuando se introduce el vector en las células, se pueden usar métodos de inserción específicos de lugar. Los métodos de inserción específicos de lugar se conocen bien en la técnica e incluyen pero no se limitan a, recombinación homóloga e inserción de genoma mediada por recombinasa. Por supuesto, si se van a usar métodos de inserción específicos de lugar en los métodos de la presente invención, los vectores pueden comprender elementos que ayuden a esta inserción específica de lugar, tales como pero no limitados, recombinación homóloga. Por ejemplo los vectores pueden comprender uno, dos, tres, cuatro o más sitios de integración genómica (GIS). Como se usa en el presente documento, un "sitio de integración genómica" se define como una parte de la secuencia del vector cuya secuencia de nucleótidos es idéntica o casi idéntica a partes del genoma de las células que permiten la inserción del vector en el genoma. En particular, el vector puede comprender dos sitios de inserción genómica que flanquean al menos el promotor de gen marcador de enfermedad y el polinucleótido que codifica el polipéptido letal. Por supuesto, el GIS puede flanquear elementos adicionales, o incluso todos los elementos presentes en el vector.

45 En otra realización, la inserción específica de lugar se puede llevar a cabo por inserción génica específica de sitio de recombinasa. En resumen, las enzimas recombinasas bacterianas, tales como pero no limitadas a, PhiC31 integrasa pueden actuar en sitios de "pseudo" recombinación en el genoma humano. Estos sitios de pseudo recombinación pueden ser dianas para inserción específica de lugar que usan las recombinasas. La inserción génica específica de sitio de recombinasa se describe en Thyagarajan, B. *et al.*, Mol. Cell Biol. 21(12):3926-34 (2001). Otros ejemplos de recombinasas y sus respectivos sitios que se pueden usar para inserción génica específica de sitio de recombinasa incluyen pero no se limitan a, serina recombinasas tales como R4 y TP901-1.

55 Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen pero no se limitan a, genotipado de las células. El término genotipado se usa en el presente documento tal como es en la técnica. Específicamente, realizaciones particulares de los métodos de la presente invención proporcional genotipado de las células antes o después de introducir el destructor de las células enfermas. Además, los métodos contemplan el genotipado de las células una o más veces con fines de garantía de calidad. El genotipado se puede llevar a cabo de cualquier modo que proporcione información de la secuencia genética de aproximadamente la totalidad o de una parte del genoma de las células. Por ejemplo, el genotipado se puede llevar a cabo por aislamiento de ADN y posterior secuenciación, o se puede llevar a cabo mediante métodos de PCR o análisis de restricción o cualquier combinación de los mismos.

El genotipado de las células de un sujeto se puede llevar a cabo para determinar el perfil genómico de un sujeto. Esta información se puede usar para determinar si un sujeto está predispuesto a sucesos mutacionales que harían al sujeto más susceptible a la reaparición de la enfermedad en generaciones posteriores de las células no enfermas que se restituyeron al sujeto. La predisposición a sucesos mutacionales se puede identificar en general por
 5 detección de alteraciones o mutaciones en los genes que codifican la síntesis del ADN y reparan los genes o en otros genes relacionados con sucesos mutacionales en el sujeto. La predisposición a un tipo específico de enfermedad se puede identificar por detección de alteraciones o mutaciones en genes asociados con esa enfermedad. El conocimiento del genotipo de un sujeto se puede usar para diseñar polinucleótidos terapéuticos apropiados para cada sujeto. Por ejemplo, si un sujeto está predispuesto a una enfermedad particular, un promotor
 10 específico de enfermedad o un polipéptido letal particular puede ser el más adecuado. Si el sujeto está predispuesto a la reaparición de una enfermedad, sería preferente no eliminar el polinucleótido terapéutico de modo que las células enfermas se puedan purgar *in vivo* en un momento posterior si fuera necesario. En otro ejemplo, el genotipo del sujeto se puede usar para determinar si un sitio de inserción particular en el genoma es más o menos adecuado. El diseño de un polinucleótido terapéutico individualizado basado en el perfil genómico del sujeto se puede basar en
 15 elecciones para cada parámetro del polinucleótido como se muestra en la Figura 1. Un sistema de vector en el que las partes son fácilmente intercambiables, como se ha descrito anteriormente, se adapta idealmente para ensamblar polinucleótidos terapéuticos específicos de sujeto basados en la genética del sujeto.

Además, realizaciones particulares de los métodos de la presente invención comprenden la eliminación del polinucleótido terapéutico. En general, los métodos de la presente invención darán como resultado la introducción de los polinucleótidos terapéuticos en todas o la mayoría de las células, independientemente de la patología de las células. Por ello, puede ser deseable retirar el polinucleótido o polinucleótidos terapéuticos de las células no enfermas. Para ayudar a su propia eliminación, el constructo puede comprender por lo tanto elementos adicionales
 20 tales como sitios de recombinasa. Un ejemplo de un sitio de recombinasa incluye pero no se limita a, el sitio loxP en el bien conocido cre-lox o los sitios de recombinasa asociados a las recombinasas Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Cin, Tn3 resolvasa, ΦC31, TndX, XerC y XerD. Se pueden usar otros sitios de recombinasa, siempre que una enzima recombinasa apropiada pueda actuar en el sitio de recombinasa. El constructo también puede contener genes que codifican una o más recombinasas. La expresión de recombinasas puede estar bajo el control de promotores inducibles de modo que se pueda inducir la eliminación en el momento deseado.

El polinucleótido terapéutico se puede eliminar de las células supervivientes después de que las células enfermas se hayan destruido y antes de que las células supervivientes se restituyan al sujeto. Alternativamente, las células supervivientes se pueden usar para tratar al sujeto sin la eliminación del polinucleótido terapéutico. En esta situación, la expresión del polipéptido letal se puede inducir *in vivo* en cualquier momento después de que las células se restituyan al sujeto. Esto se puede usar si existe una reaparición de la enfermedad en el sujeto. La reaparición se
 35 puede producir por cualquier razón, incluyendo predisposición del sujeto a sucesos mutacionales que conducen a la reaparición de la enfermedad en generaciones posteriores de las células no enfermas que se restituyeron al sujeto. La reaparición también se puede producir debido al purgado incompleto de la totalidad de las células enfermas antes de la restitución de las células al sujeto. La capacidad para destruir las células enfermas *in vivo* (por ejemplo, teniendo el polipéptido letal bajo el control de un promotor inducible y proporcionando el agente inductor al sujeto) permite que el sujeto evite un ciclo de trasplante *ex vivo* adicional y los riesgos asociados al ciclo (por ejemplo, la irradiación/quimioterapia requerida para eliminar la médula ósea antes del trasplante). Esta realización también permite al médico clínico controlar el comienzo, nivel y duración *in vivo* del polipéptido letal.

En una realización adicional, el polinucleótido terapéutico puede comprender un gen de quimiorresistencia, por ejemplo, el gen de resistencia a múltiples fármacos *mdr1*. El gen de quimiorresistencia puede estar bajo el control de un promotor constitutivo (por ejemplo, CMV) o inducible (por ejemplo, RheoSwitch®). En esta realización, si se produce en la reaparición de la enfermedad en el sujeto, un médico clínico puede aplicar una dosis más potente de un agente quimioterapéutico para destruir las células enfermas mientras que las células restituidas estarían protegidas del agente. Al colocar el gen de quimiorresistencia bajo un promotor inducible, se puede evitar la expresión innecesaria del gen de quimiorresistencia y aún así todavía estaría disponible en el caso de la reaparición de la enfermedad. Si las células restituidas se volvieron enfermas, todavía se podrían destruir por inducción de la expresión del polipéptido letal como descrito anteriormente.

Otras realizaciones más contemplan analizar y/o prolongar la supervivencia de la población celular antes de usar las células para tratar al sujeto. Por ejemplo, las células supervivientes se pueden genotipar y/o fenotipar, usando cualquiera de los métodos o protocolos descritos o mencionados en el presente documento, antes de usar las células en el tratamiento del sujeto.

La presente divulgación también describe kits que se pueden usar junto con los métodos de la invención. Los kits pueden comprender uno o más recipientes, que pueden contener uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en una o más moléculas de ácido nucleico, enzimas de restricción y una o más células que comprenden tales moléculas de ácido nucleico. Los kits pueden comprender además uno o más recipientes que contienen medios de cultivo celular adecuados para cultivar células de la invención, uno o más recipientes que
 65 contienen antibióticos adecuados para usar en el cultivo de células de la invención, uno o más recipientes que contienen tampones, uno o más recipientes que contienen reactivos de transfección y/o uno o más recipientes que

contienen sustratos para reacciones enzimáticas.

5 Los kits pueden contener una amplia diversidad de moléculas de ácido nucleico que se pueden usar con la invención. Algunos ejemplos de moléculas de ácido nucleico que se pueden suministrar en los kits incluyen las que contienen promotores, secuencias que codifican polipéptidos letales, potenciadores, represores, marcadores de selección, señales de transcripción, señales de traducción, sitios de hibridación de cebador (por ejemplo, para secueñación o PCR), sitios de recombinación, sitios de restricción y policonectores, sitios que suprimen la terminación de la traducción en presencia de un ARNt supresor, secuencias que codifican ARNt supresor, secuencias que codifican dominios y/o regiones, orígenes de replicación, telómeros, centrómeros y similares. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden comprender uno cualquiera o más de estas características además de una secuencia reguladora transcripcional como se ha descrito anteriormente.

15 Los kits pueden comprender recipientes que contienen una o más proteínas de recombinación. Algunas proteínas de recombinación adecuadas incluyen pero no se limitan a, Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, Cin, Tn3 resolvasa, Φ C31, TndX, XerC y XerD. Otros sitios y proteínas de recombinación adecuados son los asociados a la Tecnología de Clonación GATEWAY™ disponible en Invitrogen Corp., Carlsbad, CA y descritos en la literatura de producto de la Tecnología de Clonación GATEWAY™.

20 En uso, una molécula de ácido nucleico que comprende uno o más promotores de gen marcador de enfermedad (P) proporcionada en un kit de la invención se puede combinar con un polinucleótido de expresión para un polipéptido letal (E) y una secuencia reguladora 3' (3) para preparar un programa génico PE3. La molécula de ácido nucleico que comprende una o más secuencias reguladoras 3' se puede proporcionar, por ejemplo, con un pivote molecular en los extremos 5' y 3' de la secuencia reguladora 3'.

25 Los kits también se pueden suministrar con cebadores. Estos cebadores se diseñarán generalmente para hibridar las moléculas que tienen secuencias de nucleótidos específicas. Por ejemplo, estos cebadores se pueden diseñar para uso en PCR para amplificar una molécula de ácido nucleico particular. También se pueden suministrar con el kit cebadores de secuenciación.

30 Se pueden suministrar en los kits uno o más tampones (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, ocho, diez, quince). Estos tampones se pueden suministrar en concentraciones de trabajo o se pueden suministrar en forma concentrada y a continuación diluirse en las concentraciones de trabajo. Estos tampones contienen a menudo sal, iones metálicos, cofactores, agentes quelantes de iones metálicos, etc. para la mejora de actividades o la estabilización del propio tampón o de las moléculas en el tampón. Además, estos tampones se pueden suministrar en forma seca o acuosa. Cuando los tampones se suministran en una forma seca, generalmente se disolverán en agua antes de su uso.

40 Los kits pueden contener prácticamente cualquier combinación de los componentes expuestos anteriormente o descritos en otra parte en el presente documento. Como reconocería el experto en la materia, los componentes suministrados con los kits de la invención variarán con el uso destinado para los kits. De este modo, los kits se pueden diseñar para llevar a cabo diversas funciones expuestas en la presente solicitud y los componentes de tales kits variarán en consecuencia.

45 La presente divulgación también se refiere a instrucciones para llevar a cabo uno o más métodos de la invención. Tales instrucciones pueden enseñar a un usuario las condiciones adecuadas para llevar a cabo los métodos de la invención. Las instrucciones pueden estar en una forma tangible, por ejemplo, instrucciones escritas (por ejemplo, mecanografiadas en papel), o pueden estar en una forma intangible, por ejemplo, accesible mediante un disco de ordenador o en Internet.

50 Hay que reconocer que no es necesario proporcionar un texto completo de instrucciones para llevar a cabo un método de la invención o, cuando las instrucciones estén incluidas en un kit, para el uso de kit. Un ejemplo de una situación en la que un kit de la invención, por ejemplo, no contendría tales instrucciones de longitud completa es cuando las instrucciones proporcionadas informan a un usuario de los kits de dónde obtener instrucciones para poner en práctica los métodos para los que se puede usar el kit. De este modo, las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención se pueden obtener en páginas web de Internet, manuales comercializados o distribuidos por separado u otra literatura de producto, etc. Por ejemplo, los kits pueden dirigir a un usuario del kit a una o más ubicaciones donde se pueden encontrar las instrucciones no envasadas y/o distribuidas directamente con los kits. Tales instrucciones pueden estar en cualquier forma que incluye pero no se limita a, formas electrónicas o impresas.

60 Los siguientes ejemplos son ilustrativos pero no limitantes, de los métodos de la presente invención. Otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de la diversidad de condiciones y parámetros encontrados normalmente en el tratamiento médico y los sistemas de expresión de genes y que son obvios para los expertos en la materia están dentro del alcance de la invención.

65

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Se obtienen y aíslan células CD34⁺ de la sangre de un paciente con leucemia mieloide. Las células aisladas se tratan *ex vivo* con un constructo de polinucleótido terapéutico de la presente invención que comprende un gen de selección de neomicina (neo) bajo el control del promotor constitutivo ubicuo de citomegalovirus (CMV) y el activador trans inducible rTTA bajo el control del promotor TERT. Una secuencia que codifica la toxina de la difteria (DTA) está bajo el control del promotor inducible TetO. A continuación se lleva a cabo la transformación celular en condiciones que estimulan la integración aleatoria del constructo terapéutico en el genoma. Los transformantes estables se seleccionan mediante la adición de G418. Las colonias supervivientes se tratan a continuación con tetraciclina o doxiciclina para activar la expresión del producto génico letal DTA en las células en las que el promotor TERT dirige la expresión del producto proteico rTTA. La adición de tetraciclina o doxiciclina y la expresión de rTTA conducen a la destrucción de las células enfermas en las que el promotor TERT está activo.

15 El vector que se muestra en la FIGURA 6 es un ejemplo de un diseño de vector que puede ser útil para los métodos del presente ejemplo. La caracterización del sitio o sitios de inserción genómica se lleva a cabo usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, las células donde se han insertado los constructos en un sitio bionneutral se hacen crecer y se expanden en condiciones que proporcionan presión selectiva sobre las células que comprenden los constructos.

20 Estas colonias expandidas se fenotipan para indicar la presencia o ausencia de genes marcadores de enfermedad. El fenotipo también se puede evaluar para determinar la capacidad de las células para mantener la plasticidad de una célula progenitora según se evalúa mediante biomarcadores progenitores conocidos, que incluyen pero no se limitan a, biomarcadores CD34⁺. Las poblaciones de células que superan el análisis fenotípico final se trasplantarán a continuación al paciente donante. Antes del trasplante, se puede realizar la ablación de las células sanguíneas/médula ósea de los pacientes mediante metodologías químicas o radiactivas.

Ejemplo 2

30 Se obtienen y se aíslan células de sangre periférica de la sangre de un paciente con cáncer de origen de células sanguíneas. Las células aisladas se tratan *ex vivo* con un constructo de polinucleótido terapéutico de la presente invención que comprende un gen de selección de neomicina (neo) bajo el control del promotor aldehído deshidrogenasa y el activador trans inducible rTTA bajo el control del promotor TERT. Una secuencia que codifica la toxina de la difteria (DTA) está bajo el control del promotor inducible TetO y un promotor constitutivo de CMV controla la expresión del activador trans RheoCept[®]. A su vez, el promotor inducible RheoSwitch[®] controla la expresión de la Cre recombinasa. Los sitios loxP flanquean cada uno de los programas génicos del constructo en los extremos 5' y 3' del constructo. La transformación celular se lleva a cabo en condiciones que estimulan la integración aleatoria del ADN heterólogo en el genoma. Se añade G418 al cultivo celular para seleccionar transformantes estables que presenten un fenotipo celular progenitor, debido a que el promotor aldehído deshidrogenasa se expresa a altos niveles en las células progenitoras que comprenden el constructo. Las colonias supervivientes se tratan a continuación con tetraciclina o doxiciclina para activar la expresión del producto génico letal DTA en las células en las que el promotor TERT dirige la expresión del producto proteico rTTA.

45 El vector que se muestra en la FIGURA 7 es un ejemplo de un diseño de vector que puede ser útil para los métodos del presente ejemplo. La caracterización del sitio o sitios de inserción genómica se lleva a cabo usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, las células donde se han insertado los constructos en un sitio bionneutral se hacen crecer y se expanden en condiciones que proporcionan presión selectiva sobre las células que comprenden los constructos.

50 Estas colonias expandidas se fenotipan para indicar la presencia o ausencia de genes marcadores de enfermedad. El fenotipo también se puede evaluar para determinar la capacidad de las células para mantener la plasticidad de una célula progenitora según se evalúa mediante biomarcadores progenitores conocidos, que incluyen pero no se limitan a, CD34⁺ y aldehído deshidrogenasa. Las poblaciones de células que superan el análisis fenotípico final se trasplantarán a continuación al paciente donante. Antes del trasplante, se puede realizar la ablación de las células sanguíneas/médula ósea de los pacientes mediante metodologías químicas o radiactivas. La eliminación del vector se puede inducir en cualquier momento por exposición de las células a un agonista del receptor de ecdisona para inducir la expresión de la Cre recombinasa.

Ejemplo 3

60 Para prevenir la metástasis y reducir las células del cáncer circulantes, por ejemplo, células del cáncer de mama, en un paciente de cáncer posquirúrgico, se obtienen y se aíslan células de sangre periférica de un paciente que tiene o ha tenido cáncer de mama. Estas células aisladas se tratan *ex vivo* con un constructo terapéutico que comprende el gen de citidina desaminasa (CDA) bajo el control del promotor ubicuo expresado constitutivamente fosfoglicerato quinasa (PGK) y una parte del ADN que es homólogo al lugar equivalente ROSA bionneutral. En el constructo, el gen

de selección neo está bajo el control del promotor aldehído deshidrogenasa y el activador trans inducible rTTA está bajo el control del promotor TERT. Además, la secuencia que codifica la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS) está bajo el control del promotor inducible TetO y una región adicional de ADN homólogo al lugar equivalente ROSA bionneutral que está situada 3' de la primera región de ADN. Además, el gen de la toxina de la difteria (DTA) está bajo el control del promotor de CMV expresado constitutivamente. La transformación celular se lleva a cabo en condiciones que estimulan la inserción específica de lugar mediante recombinación homóloga. Los transformantes estables que presentan un fenotipo celular progenitor se seleccionan mediante la adición de G418 debido a que el promotor aldehído deshidrogenasa se expresa con altos niveles en las células progenitoras.

El vector que se muestra en la FIGURA 8 es un ejemplo de un diseño de vector que puede ser útil para los métodos del presente ejemplo. Específicamente, el constructo se inserta en el genoma en el lugar equivalente ROSA bionneutral. La pérdida del selector DTA del constructo indica que la recombinación homóloga tuvo éxito. El tratamiento con 5-fluorocitosina sirve como un selector negativo para la pérdida del gen selector CDA. La caracterización del sitio de inserción genómica se lleva a cabo usando métodos conocidos en la técnica.

Las colonias en las que las partes del constructo interno a las regiones de recombinación homólogas se han integrado en el genoma en el lugar equivalente ROSA bionneutral se seleccionan y se expanden. Estas células expandidas se tratan a continuación con tetraciclina o doxiciclina además de ganciclovir. El tratamiento con tetraciclina o doxiciclina conducirá a la activación del promotor TetO en las células que expresan el gen marcador de enfermedad de elección, que a su vez activará la expresión del producto génico TK. El tratamiento con ganciclovir elimina selectivamente las células que expresan timidina quinasa con altos niveles de expresión.

Estas colonias expandidas se fenotipan para indicar la presencia o ausencia de genes marcadores de enfermedad. El fenotipo también se puede evaluar para determinar la capacidad de las células para mantener la plasticidad de una célula progenitora según se evalúa mediante biomarcadores progenitores conocidos, que incluyen pero no se limitan a, CD34⁺ y aldehído deshidrogenasa. Las poblaciones de células que superan el análisis fenotípico final se trasplantarán a continuación al paciente donante. Antes del trasplante, se puede realizar la ablación de las células sanguíneas/médula ósea del paciente mediante metodologías químicas o radiactivas.

Ejemplo 4

Se obtienen y se aíslan células de sangre periférica de la sangre de un paciente con cáncer de origen de células sanguíneas. Las células aisladas se tratan *ex vivo* con un constructo de polinucleótido terapéutico de la presente invención que comprende un gen de selección de neomicina (neo) bajo el control del promotor aldehído deshidrogenasa y la secuencia que codifica la toxina de la difteria (DTA) bajo el control del promotor TERT. La transformación celular se lleva a cabo en condiciones que estimulan la integración aleatoria del ADN heterólogo en el genoma. Se añade G418 al cultivo celular para seleccionar transformantes estables que presenten un fenotipo celular progenitor, debido a que el promotor aldehído deshidrogenasa se expresa con altos niveles en células progenitoras que comprenden el constructo.

La caracterización del sitio o sitios de inserción genómica se lleva a cabo usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, las células donde se han insertado los constructos en un sitio bionneutral se hacen crecer y se expanden en condiciones que proporcionan presión selectiva sobre las células que comprenden los constructos.

Estas colonias expandidas se fenotipan para indicar la presencia o ausencia de genes marcadores de enfermedad. El fenotipo también se puede evaluar para determinar la capacidad de las células para mantener la plasticidad de una célula progenitora según se evalúa mediante biomarcadores progenitores conocidos, que incluyen pero no se limitan a, CD34⁺ y aldehído deshidrogenasa. Las poblaciones de células que superan este análisis fenotípico final se trasplantarán a continuación al paciente donante sin eliminación del polinucleótido terapéutico. Antes del trasplante, se puede realizar la ablación de las células sanguíneas/médula ósea de los pacientes mediante metodologías químicas o radiactivas.

Tras la reaparición del cáncer de células sanguíneas en el paciente, se activará la expresión de DTA a partir del promotor TERT en las células trasplantadas y estas células se destruirán.

Ejemplo 5

Se atienden y se aíslan células de sangre periférica de un paciente con cáncer de origen de células sanguíneas. Las células aisladas se tratan *ex vivo* con un constructo de polinucleótido terapéutico de la presente invención que comprende un gen de selección de neomicina (neo) bajo el control del promotor aldehído deshidrogenasa y el activador trans inducible RheoCept[®] bajo el control del promotor TERT. A su vez, el promotor inducible RheoSwitch[®] controla la expresión de DTA. La transformación celular se lleva a cabo en condiciones que estimulan la integración aleatoria del ADN heterólogo en el genoma. Se añade G418 al cultivo celular para seleccionar transformantes estables que presentan un fenotipo celular progenitor, debido a que el promotor aldehído deshidrogenasa se expresa con altos niveles en células progenitoras que comprenden el constructo. Las colonias supervivientes se tratan a continuación con agonista de RheoCept[®] para activar la expresión del producto génico letal DTA en las células en

las que el promotor TERT dirige la expresión del producto proteico RheoCept®.

5 La caracterización del sitio o sitios de inserción genómica se lleva a cabo usando métodos conocidos en la técnica. En una realización, las células donde se han insertado los constructos en un sitio bionéutro se hacen crecer y se expanden en condiciones que proporcionan presión selectiva sobre las células que comprenden los constructos.

10 Estas colonias expandidas se fenotipan para indicar la presencia o ausencia de genes marcadores de enfermedad. El fenotipo también se puede evaluar para determinar la capacidad de las células para mantener la plasticidad de una célula progenitora según se evalúa mediante biomarcadores progenitores conocidos, que incluyen pero no se limitan a, CD34⁺ y aldehído deshidrogenasa. Las poblaciones de células que superan este análisis fenotípico final se trasplantarán a continuación al paciente donante sin eliminación del polinucleótido terapéutico. Antes del trasplante, se puede realizar la ablación de las células sanguíneas/médula ósea de los pacientes mediante metodologías químicas o radiactivas.

15 Tras la reaparición del cáncer de células sanguíneas en el paciente, se administra un agonista de RheoCept® al paciente, mediante lo cual se induce la expresión del producto génico DTA en las células trasplantadas o su progenie entre las que el promotor TERT dirige la expresión del producto proteico RheoCept®.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *ex vivo* de obtención de células vivas no enfermas siendo dichas células adecuadas para tratar en un sujeto una enfermedad destruyendo células enfermas, en el que dichas células se obtienen mediante un método que comprende
- 10 (a) determinar la actividad de al menos un gen marcador de enfermedad en una población de células obtenida de dicho sujeto;
- (b) introducir en dichas células un polinucleótido que codifica un marcador seleccionable y un polipéptido que es por sí mismo letal para dichas células, en donde la expresión de dicho polipéptido letal está controlada directa o indirectamente por el promotor de dicho al menos un gen marcador de enfermedad;
- 15 (c) exponer dichas células a condiciones de selección para obtener células que comprenden dicho polinucleótido;
- (d) tratar dichas células en condiciones que induzcan a la expresión de dicho polipéptido letal, en donde dicha expresión de dicho polipéptido letal elimina dichas células que expresan dicho al menos un gen marcador de enfermedad; y
- (e) separar dichas células eliminadas de las células vivas no enfermas restantes, en donde dichas células vivas no expresan dicho polipéptido letal en una extensión suficiente como para eliminar dichas células no enfermas.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho promotor se une de forma operativa a dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido letal.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dichas células se seleccionan entre el grupo que consiste en células madre hematopoyéticas, células madre hepáticas, células madre mamarias, células madre pancreáticas y células madre neuronales.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que dichas células son células madre hematopoyéticas.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha introducción de dicho polinucleótido comprende la transfección transitoria de dicho polinucleótido en dichas células.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha introducción de dicho polinucleótido comprende la transfección estable de dicho polinucleótido en dichas células.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido comprende al menos dos programas génicos.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el que dicho promotor de dicho gen marcador de enfermedad está ligado entre un primer y un segundo pivote de inserción molecular.
9. El método de la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido letal está ligado entre un segundo y un tercer pivotes de inserción molecular.
- 40 10. El método de las reivindicaciones 8 o 9, en el que dichos pivotes de inserción molecular están formados por tres o cuatro sitios de restricción raros o poco comunes en una disposición contigua, seleccionándose dichos sitios de restricción raros o poco comunes entre el grupo que consiste en los sitios de restricción que correlacionan con las enzimas de restricción AsiS I, Pac I, Sbf I, Fse I, Asc I, Mlu I, SnaB I, Not I, Sal I, Swa I, Rsr II, BSiW I, Sfo I, Sgr AI, Afl III, Pvu I, Ngo MIV, Ase I, FIp I, Pme I, Sda I, Sgf I, Srf I y Sse878 I.
- 45 11. El método de la reivindicación 7, en el que el polinucleótido comprende además al menos un dominio de modificación de cromatina.
- 50 12. El método de la reivindicación 1, en el que dicha introducción de dicho polinucleótido comprende la inserción específica de lugar de dicho polinucleótido.
13. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido está contenido en un vector.
- 55 14. El método de la reivindicación 1, en el que dicho vector es un vector viral.

Figura 1

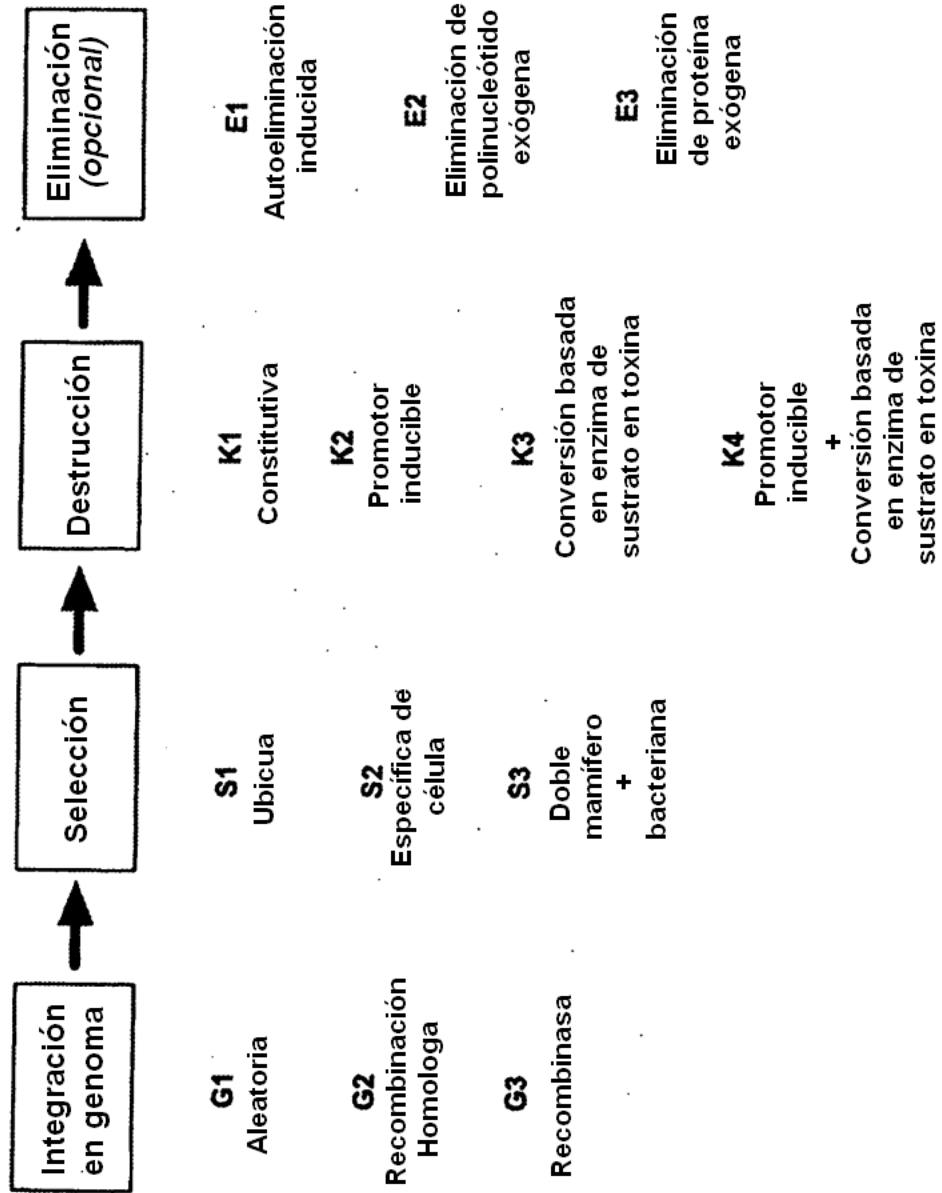


Figura 2

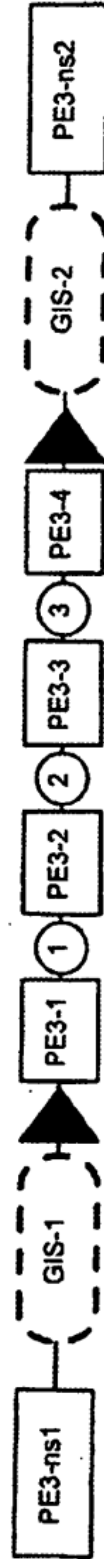


Figura 3

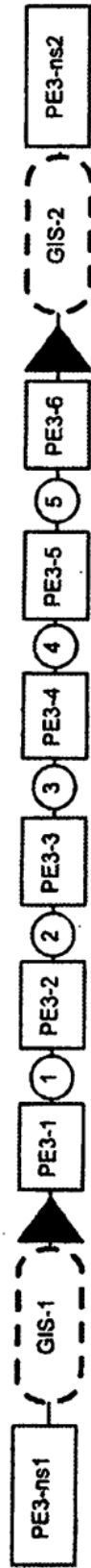


Figura 4

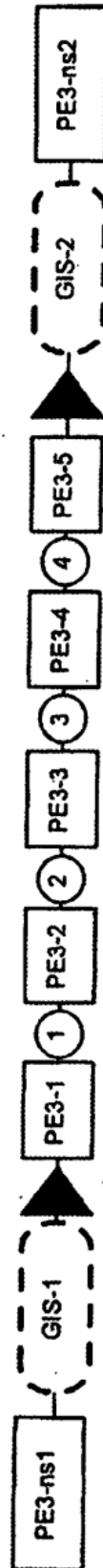


Figura 5

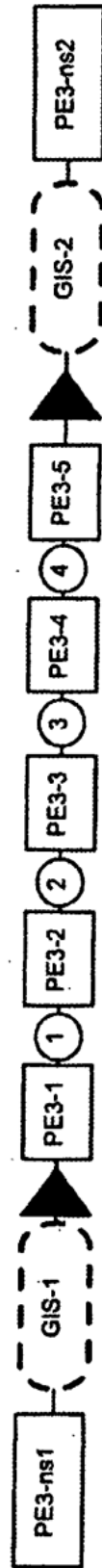


Figura 6

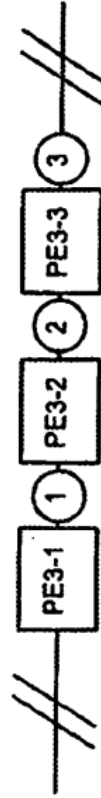


Figura 7

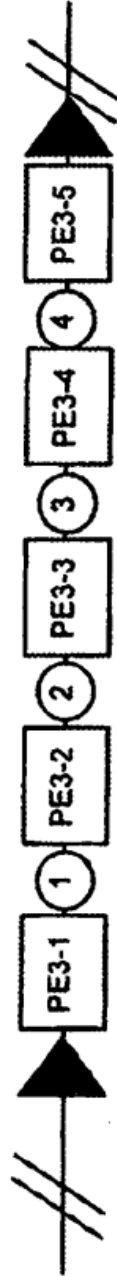


Figura 8

