

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 143**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2013 PCT/EP2013/072823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14068063**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2013 E 13789744 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2914721**

54 Título: **Molécula de ARN de trans-empalme (RTM) para su uso en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**02.11.2012 GB 201219762**

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

**31.01.2018**

73 Titular/es:

**BAUER, JOHANN (100.0%)  
Paracelsus Medical University Salzburg Muellerner  
Hauptstrasse 48  
5020 Salzburg, AT**

72 Inventor/es:

**GRUBER, CHRISTINA y  
KOLLER, ULRICH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 652 143 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

Molécula de ARN de trans-empalme (RTM) para su uso en el tratamiento del cáncer

**Campo de la invención**

5 La presente invención pertenece a una nueva molécula de pre-ARNm de trans-empalme (RTM) que comprende una región de unión que es complementaria a un pre-ARNm de un gen asociado con tumores, y un dominio codificante que codifica un gen suicida. Realizaciones específicas de la presente invención se refieren a RTM que median en el trans-empalme de un gen suicida tal como la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk), con el pre-ARNm del miembro 1B3 (SLCO1B3) de la familia de transportador aniónico orgánico del vehículo de soluto genético asociado con el carcinoma de células escamosas. La invención proporciona RTM que destruyen selectivamente  
10 células que expresan SLCO1B3 y que por lo tanto son útiles en el tratamiento del cáncer, específicamente el carcinoma de células escamosas asociado con epidermólisis bullosa. También se proporcionan procedimientos, kits y composiciones farmacéuticas relativas a los RTM de acuerdo con la invención.

**Descripción**

15 La mayoría de las estrategias para la eliminación de tumores se enfocan en la inducción de muerte celular mediada por toxinas en las células tumorales. Se suministra un transgén que codifica una toxina en las células tumorales dando lugar a la muerte celular posterior de las células. La expresión ineficaz del gen terapéutico debido a obstáculos en el suministro del fármaco y la especificidad de direccionamiento a las células tumorales siguen siendo los obstáculos actuales de esta tecnología hasta la fecha. Uno de los genes suicidas más establecidos es el de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk). Esta enzima presenta una alta afinidad por el sustrato del análogo de nucleósido ganciclovir (GCV). El profármaco ganciclovir se convierte en el metabolito GCV trifosfato (GCVTP) dando como resultado un efecto tóxico intracelular. Al fosforilarse, el GCV se incorpora en el ADN en replicación dando lugar a la inhibición de la polimeración de ADN y finalmente a la muerte celular por apoptosis.

20 El ARN de trans-empalme es una tecnología para suministrar información genética en un ARN diana para aprovechar el empalmosoma endógeno de la célula. La reacción de trans-empalme está facilitada por las moléculas de ARN de trans-empalme (RTM) que consisten en un domino de unión (BD) para el direccionamiento genético, un domino de corte y empalme para el trans-empalme eficaz y un domino codificante que comprende la secuencia a introducir. La unión de un RTM al pre-ARNm diana induce el trans-empalme específico entre ambas moléculas dando como resultado un nuevo producto genético que consiste en el ARNm endógeno y la secuencia codificante proporcionada por el RTM.

25 Este sistema ya se había aplicado *in vitro* e *in vivo* para corregir genes mutados en varias enfermedades genéticas, tales como la epidermólisis bullosa (EB), fibrosis quística, hemofilia A, atrofia muscular espinal. Además, se puede utilizar SMaRT para producir altos niveles de proteína terapéuticas y anticuerpos *in vivo* generando moléculas químicas.

30 Debido al hecho de que los RTM proporcionan la expresión celular específica uniendo a un gen diana determinado, el ARN de trans-empalme se consideró también como terapia genética del cáncer. En primer lugar Puttaraju y col (Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. Puttaraju M, Jamison SF, Mansfield SG, Garcia-Blanco MA, Mitchell LG. Nat Biotechnol. 1999 Mar; 17(3):246-52.) demostraron el trans-empalme preciso entre el gen 6 de gonadotropina coriónica humana y un RTM *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, para una aplicación clínica satisfactoria de los RTM suicidas en el cáncer EB la eficacia y especificidad tiene que mejorarse con el fin de proporcionar una capacidad de destrucción celular aumentada con pocos efectos secundarios. Por lo tanto, los inventores evaluaron los RTM que contienen el sistema HSV-TK/GCV aprobado clínicamente. En un sistema de doble transfección, los inventores analizaron los RTM que se dirigían al miembro 1B3 (SLCO1B3) de la familia de transportador aniónico de vehículo orgánico, un marcador genético asociado con distintos cánceres humanos incluyendo los adenocarcinomas colorrectales, de mama y el cáncer de pulmón y el más importante RDEB-SCC. La sobre-expresión de SLCO1B3 también la confirmaron los inventores utilizando una PCR semi-cuantitativa en tiempo real y análisis de micromatrices (datos no mostrados).

35 C. Gruber y col.: "Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing Facilitates Targeted Delivery of Suicide Genes to Cancer Cells", Mol. Cancer Ther., vol. 10, nº 2, 1 Febrero 2011, páginas 233-241 desvela una molécula de ARN de trans-empalme mediado por empalmosoma (RTM/SMaRT) para el suministro dirigido de genes suicidas en células cancerosas *in vitro*. La moléculas que se utiliza tiene un domino de unión complementario a la MMP9 y el gen de toxina es de estreptolisina O (SLO) o HSV timidina cinasa. El dominio de unión es complementario de SLCO1B3.

40 El documento WO 2010/012472 A1 desvela los pre-ARNm COL7A1 y PLEC1 que se utilizan para el trans-empalme y también desvela una lista de genes potenciales que se pueden utilizar para los mismos fines, que se expresan todos en la piel, pero no sugieren SLCO1B3.

45 En vista de los defectos descritos anteriormente en la técnica antecedente. el objetivo de la presente invención es proporcionar una nueva estrategia terapéutica para dirigirse a enfermedades proliferativas, en particular el carcinoma de células escamosas asociado con epidermólisis bullosa, por la introducción de un gen suicida que

permite la destrucción selectiva de células malignas al mismo tiempo que se excluyen los tejidos sanos.

En un primer aspecto de la presente invención, el objetivo anterior se resuelve proporcionando una molécula de ARN de trans-empalme (RTM), que comprende al menos un dominio de unión, al menos un dominio de corte y empalme y al menos un dominio codificante, que se caracteriza por que el dominio codificante comprende un gen suicida que se selecciona de entre genes suicidas timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), citosina desaminasa (CD), timidina cinasa de virus de Varicella Zoster (VZV-tk), Estreptolisina O y toxina diftérica, y dicho al menos un dominio de unión comprende una secuencia complementaria del pre-ARNm del miembro 1B3 de la familia del transportador aniónico del vehículo orgánico de soluto (SLCO1B3).

La eliminación de las células tumorales encara un gran desafío debido a múltiples problemas. Uno de dichos obstáculos es la discriminación entre células normales y malignas. El patrón de expresión genética variable de estas poblaciones celulares abre nuevas avenidas hacia una estrategia de terapia más específica de las células. En este trabajo los inventores describieron la posibilidad de dirigirse a los genes sobre-expresados en las células tumorales utilizando un procedimiento de ARN de trans-empalme mediado por empalmosoma (SMaRT) basado en ARNm. El ARN de trans-empalme se puede utilizar como una técnica específica del gen y la célula para inducir la muerte celular mediada por toxinas predominantemente en células tumorales. Los genes marcadores específicos que se dirigen al tumor proporcionarán una especificidad celular más alta, reduciendo los efectos secundarios comunes en las aplicaciones basadas en toxinas convencionales. La introducción de un RTM que alberga una toxina en células diana debería dar lugar a una reacción de trans-empalme específico entre el marcador genético tumoral y el RTM, dando como resultado un ARNm de fusión gen-toxina. La posterior expresión de la proteína de fusión desarrolla el impacto de la toxina que destruye la célula.

En una primera realización preferida de la invención, el RTM se diseña para que comprenda solamente un número mínimo de codones de inicio (ATG) o sitios de corte y empalme crípticos corriente arriba de la secuencia que contiene el dominio codificante del gen suicida. Estos es necesario para reducir la expresión no deseable del gen suicida sin que se haya fusionado a la secuencia de exón diana mediante el trans-empalme. Dichos eventos pueden producirse por traducción en fase directa del RTM a partir de un codón de inicio no deseado o debido a sitios de corte y empalme crípticos en el RTM que dan lugar al empalme con otros ARNm o eventos de corte y empalme en cis que de nuevo dan lugar a la expresión no controlada del gen suicida. Específicamente se prefiere que el RTM de la invención no comprende ningún codón de inicio o sitios de corte y empalme crípticos corriente arriba o en el dominio de unión del RTM o más preferentemente, en el que el RTM no comprenda ningún codón o sitios de corte y empalme crípticos corriente arriba de la secuencia codificante del gen suicida. La expresión sitio de corte y empalme críptico denota cualquier sitio de corte y empalme que no está en proximidad directa del dominio codificante y que por lo tanto puede resultar en productos de corte o empalme cis o trans que no dependen de la unión selectiva del dominio de unión a su secuencia diana (complementaria) y que puede expresar el gen suicida. Dichos RTM no selectivos están en una realización preferida no incluida en la invención, ya que podrían inducir la muerte celular sin ninguna selectividad para la célula diana.

El diseño general, construcción y modificación genética de los RTM y la demostración de su capacidad para inducir reacciones de trans-empalme mediado por empalmosoma en las células se describen en detalle en las Pat. de EE. UU. N° 6.083.702, 6.013.487, 7.399.753 y 6.280.978 así como las solicitudes de patente con los N° de Serie de EE. UU. 09/756.095, 09/756.096, 09/756.097 y 09/941.492.

En resumen se diseña una molécula de RTM para que albergue un dominio de unión (BD) complementario y en orientación antisentido respecto a una secuencia de intrón del pre-ARNm diana, para suprimir el corte y empalme cis de la diana a la vez que aumenta el trans-empalme entre el RTM y la diana (Mansfield y col. 2000). Un RTM consiste adicionalmente en un dominio de corte y empalme, que comprende una secuencia de punto de ramificación fuertemente conservada (BP), un tracto de polipirimidina (PPT), y un sitio receptor de corte y empalme 3' (ss). Una secuencia espaciadora separa el dominio de corte y empalme del dominio de unión a la diana. Y finalmente un RTM comprende un dominio codificante con la parte de la secuencia de tipo silvestre para ser trans-empalmada al pre-ARNm. El dominio codificante puede ser un único exón, múltiples exones o una secuencia codificante completa. En el contexto de la presente invención, el dominio codificante preferentemente es una secuencia codificante completa de un gen suicida, sin embargo, sin el codón de inicio de la traducción (codón de inicio: ATG) El BD da la especificidad al trans-empalme uniéndose específicamente al pre-ARNm diana endógeno, mientras que los dominios de corte y empalme y codificante proporcionan motivos de consenso esenciales que son reconocidos por el empalmosoma y hace que se produzca actualmente la reacción de trans-empalme. El uso de BP y PPT seguida por las secuencias de consenso que se necesitan para realizar la reacción de transferencia de dos fosforilos implicada en el corte y empalme en cis y, presumiblemente, también en el trans-empalme (Kramer 1996). Estas reacciones, catalizadas por el empalmosoma, deben escindir los intrones con precisión con el fin de producir ARNm funcionales. De manera similar a los procesos de corte y empalme cis, las secuencias del dominio de unión y el dominio de corte y empalme del ARN RTM se escinden después del trans-empalme y no se mantienen en los productos de ARNm finales reprogramados.

Los procedimientos de la invención engloban poner en contacto los RTM de la invención con un pre-ARN diana, en condiciones en las que una parte del RTM se trans-empalma con una parte del pre-ARNm diana para formar una nueva molécula de ARN que se procesa adicionalmente y se expresa en la célula.

El dominio de unión a la diana del RTM otorga al RTM una afinidad de unión por el pre-ARNm diana. Como se utiliza en el presente documento, un dominio de unión a la diana se define como cualquier molécula, es decir, nucleótido, proteína, compuesto químico, etc., que confiere especificidad de unión y ancla el pre-ARNm estrechamente en el espacio al RTM sintético de manera que la maquinaria que procesa el empalmosoma del núcleo puede trans-empalmar una parte del RTM sintético a una parte del pre-ARNm.

El dominio de unión a la diana del RTM puede contener múltiples dominios de unión que son complementarios y con orientación antisentido respecto de la región dirigida del pre-ARNm pre-seleccionado diana. Los dominios de unión a la diana pueden comprender hasta varios cientos de nucleótidos. En realizaciones preferidas de la invención los dominios de unión pueden comprender al menos 10 a 30 y hasta varios cientos o más nucleótidos. La especificidad del RTM se puede aumentar significativamente aumentando la longitud del dominio de unión a la diana. Por ejemplo, el dominio de unión a la diana puede comprender varios cientos de nucleótidos o más. La absoluta complementariedad aunque preferida no es necesaria. Una "complementariedad" de secuencia respecto a una parte de un ARN, como se hace referencia en el presente documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para ser capaz de hibridarse con el pre-ARNm diana, formando un dúplex estable. La capacidad para hibridarse dependerá del grado de complementariedad y de la longitud del ácido nucleico (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). En general, cuanto más largo es el ácido nucleico que se hibrida, más faltas de coincidencia de bases con un ARN puede contener y formar aún un dúplex estable. Un experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de falta de coincidencia o longitud del dúplex por el uso de procedimientos convencionales para determinar la estabilidad del complejo hibridado.

La unión se puede conseguir también mediante otros mecanismos, por ejemplo, mediante la formación de una triple hélice, interacciones de aptámeros, interacciones de anticuerpos o interacciones de proteína/ácido nucleico tal como en las que se modifica el RTM para reconocer una proteína de unión específica de ARN, es decir, una proteína que se une a un pre-ARNm diana específico.

Las moléculas RTM 3' también contienen una región de corte y empalme 30 que incluye una secuencia de punto de ramificación y un sitio receptor AG de corte y empalme 30 y/o un sitio donante de corte y empalme 5'. La región de corte y empalme 3' puede comprender adicionalmente un tracto de polipirimidina. Los RTM 5' contienen una región de sitio del corte y empalme, incluyendo un sitio donante de corte y empalme GU. Las secuencias de consenso para el sitio donante de corte y empalme 5' y la región de corte y empalme utilizadas en el corte y empalme de ARN son bien conocidos en la técnica (Véase, Moore, y col., 1993, *The RNA World*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 303-358). Además, se pueden utilizar secuencias de consenso modificadas que mantengan la capacidad para funcionar como sitios de corte y empalme donantes 5' y regiones de corte y empalme 3' en la práctica de la invención. En resumen, la secuencia de consenso del sitio de corte y empalme 5' es AG/GURAGU (en la que A = adenosina, U = uracilo, G = guanina, C = citosina, R = purina y / = sitio de corte y empalme). El sitio de corte y empalme 30 consiste en tres elementos de secuencia separados: el punto de ramificación o sitio de ramificación, un tracto de polipirimidina y la secuencia de consenso 3' (YAG). La secuencia de consenso del punto de ramificación en mamíferos es YNYURAC (Y = pirimidina; N = cualquier nucleótido. La A subrayada es el sitio de la formación de la ramificación. Un tracto de polipirimidina se localiza entre el punto de ramificación y el sitio de corte y empalme receptor y es importante para la utilización de diferentes puntos de ramificación y reconocimiento del sitio de corte y empalme 3'. Recientemente, se han descrito los intrones pre-ARNm a los que se hace referencia como intrones dependientes de U12, muchos de los cuales comienzan con el dinucleótido AU y terminan con el dinucleótido AC. Las secuencias de intrón dependientes de U12 así como cualquiera de las secuencias que funcionan como secuencias receptoras/ donantes de corte y empalme también se pueden utilizar para generar RTM de la invención.

También se puede incluir en el RTM una región espaciadora para separar el sitio de corte y empalme del ARN del dominio de unión a la diana. La región espaciadora se puede diseñar para incluir características tales como (i) codones de parada que funcionarían para bloquear la traducción de cualquier RTM no empalmado y/o (ii) secuencias que aumentan el trans-empalme con el pre-ARNm diana.

El dominio codificante comprende una secuencia genética suicida seleccionada de entre los genes suicidas que codifican la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) y la citosina desaminasa (CD). La HSV-TK convierte el ganciclovir (GCV) no tóxico a un metabolito fosforilado tóxico, y la CD convierte la 5-fluorocitosina (5-FC) no tóxica en 5-fluorouracilo (5-FU) tóxico. Un gen suicida adicional es el de timidina cinasa de virus de la Varicella Zoster (VZV-tk) (desvelada en Lacey S F y col, *Analysis of mutations in the thymidine kinase genes of drug-resistant varicella-zoster virus populations using the polymerase chain reaction*, J. Gen. Virol. 72 (PT 3), 623-630, 1991). Un ejemplo adicional es Estreptolisina O (Yang WS, Park SO, Yoon AR, Yoo JY, Kim MK, Yun CO, y col. *Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O*. Mol Cancer Ther 2006; 5:1610-9.) o toxina diftérica como se utiliza en Puttaraju y col. (véase anteriormente).

Por lo tanto, las células tumorales que se dirigen selectivamente por el RTM de la invención son más susceptibles y sensibles al tratamiento de profármacos, ya que se exponen a metabolitos tóxicos como resultado de la activación de los profármacos. A este respecto, se ha descubierto que los metabolitos tóxicos activados pueden difundirse pasivamente a las células tumorales vecinas para aumentar adicionalmente la destrucción tumoral. Esto se llama un "efecto testigo". El efecto testigo tiene un papel importante en la erradicación de las células tumorales circundantes

que pueden no haber sido capaces de ser dirigidas por un RTM de la invención. Esto se produce por la transmisión del profármaco activado desde las células tumorales tratadas con el RTM (que en el caso de los procedimientos de transducción solo puede ser una pequeña fracción de la masa tumoral total) a las células tumorales no tratadas. En el sistema HSVtk/GCV, el GCV activado no es permeable a la membrana debido a sus grupos fosfato altamente cargados. Sin embargo se puede transferir a células infectadas mediante los huecos de las uniones o mediante el intercambio de vesículas apoptóticas que destruyen las células tumorales circundantes no transducidas.

Los profármacos útiles en los procedimientos de la presente invención son cualquiera que se pueda convertir en un producto tóxico, es decir, tóxico para las células tumorales. Un profármaco preferido es el ganciclovir, que se convierte *in vivo* en un compuesto tóxico por la HSV-tk (Chen y col., Cancer Res. 1996, 56: 3758-3762). Otros ejemplos representativos de profármacos incluyen Aciclovir, FIAU [1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo] (FIALURIDINE™, Moravek Biochemicals and Radiochemicals), 6-metoxipurina arabinósido (convertido por VZV-tk), y 5-fluorocitosina (convertido por la citosina desaminasa) (5-fluorocitosina, Roche).

Los profármacos, se pueden administrar fácilmente a los pacientes por médicos que son expertos habituados en la técnica. Utilizando procedimientos conocidos en el campo, dichos médicos serían capaces también de determinar la dosis más apropiada y la vía de administración del profármaco. Por ejemplo, el ganciclovir se administra preferentemente por vía sistémica (por ejemplo, vía oral o parenteral) en una dosis de aproximadamente 1-20 mg/día/kg de peso corporal; el Aciclovir se administra en una dosis de aproximadamente 1-100 mg/día/kg de peso corporal, y se administra FIAU en una dosis de aproximadamente 1-50 mg/día/kg peso corporal.

En una realización preferida de la invención, el RTM comprende al menos un dominio de unión que es complementario de un pre-ARNm asociado con un tumor. Un pre-ARNm asociado con un tumor es un precursor de ARNm transcrito de genes marcadores tumorales, es decir, genes que se expresan selectivamente en tumores en oposición a las células sanas. En la técnica, se conocen cuatro categorías de genes asociados a tumores. (I) antígenos mutados que se desarrollan durante la génesis del tumor por mutaciones puntuales o translocalizaciones en las células tumorales. Los antígenos son estrictamente específicos del tumor. (II) antígenos de cáncer/línea germinal se expresan habitualmente solamente con la línea germinal de un organismo adulto y no en el tejido somático sano. En las células cancerosas, sin embargo, debido a la pérdida de regulación epigenética, se pueden activar los genes específicos de la línea germinal. (III) antígenos de diferenciación se expresan en tumores y sus células progenitoras sanas. (IV) genes asociados al tumor sobre-expresados que presentan sol una expresión menor en las células sanas mientras que en un tumor las proteínas están fuertemente activadas.

En una realización preferida adicional de acuerdo con la presente invención se proporciona un RTM que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 6. Más preferido es el RTM de la invención que comprende una secuencia de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 4 a 6. Estos son los dominios de unión preferidos de los RTM de la invención. También están comprendidos en el contexto de la invención un RTM que tiene un dominio de unión que comprende una secuencia de ácido nucleico con al menos un 85 %, preferentemente un 90 %, más preferentemente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias presentadas en SEQ ID NO: 4 a 6.

En realizaciones preferidas de acuerdo con la invención dicho pre-ARNm asociado con el tumor es un pre-ARNm asociado con un tumor que se selecciona de entre tumores sólidos, especialmente cánceres del tracto intestinal, el páncreas, mama, estómago, cuello uterino, vejiga, riñón, próstata, ovarios, endometrio, pulmón, cerebro, piel tal como el melanoma, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células escamosas, cánceres de cabeza y cuello, mesotelioma maligno de pleura, linfoma o mieloma múltiple, glioblastoma y tumores líquidos especialmente leucemias tales como CML o ALL. Más preferido en el contexto de la invención es un pre-ARNm que se asocia con carcinoma de células escamosas en asociación con epidermólisis bullosa.

En una realización específica dicho pre-ARNm asociado con tumor es el miembro 1B3 de la familia del transportador aniónico orgánico del vehículo de soluto (SLCO1B3). El SLCO1B3 media la captación independiente de Na<sup>+</sup> de aniones orgánicos tales como el 17-beta-glucuronosil estradiol, taurocolato, triyodotironina (T3), leucotrieno C4, sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS), metotrexato y sulfobromoftaleína (BSP). La proteína codificada es un receptor transmembrana que media la captación independiente de sodio de compuestos endógenos y xenobióticos y tiene un papel crítico en el transporte de ácidos biliares y bilirrubina. Se conocen seis variantes de corte y empalme para SLCO1B3. El gen se localiza en la cadena directa del cromosoma 12: 20, 963,636-21, 243,040.

Se prefiere de acuerdo con la presente invención que el dominio de unión del RTM comprende una secuencia complementaria de un intrón del gen SLCO1B3. Sin embargo, en realizaciones adicionales de la invención, el dominio de unión también puede ser exónico, o mixto intrónico/exónico. Ejemplos de dichos dominios de unión mixtos para RTM se encuentran por ejemplo en el documento EP 2 151 248.

Se prefiere que el intrón sea un intrón que sigue al menos al primer exón codificante de la proteína, por tanto, por ejemplo, el intrón 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, más preferentemente el intrón 3 de SLCO1B3. Por lo tanto, el RTM de acuerdo con la presente invención produce preferentemente en el trans-empalme en un células un ARNm trans-empalmado que se compone del primer exón (exón 3) de SLCO1B3 y la secuencia codificante del gen suicida (por ejemplo HSV-TK) sin el codón de inicio del gen suicida. Sin embargo esto no excluirá que el RTM de la

invención contenga además secuencias con su dominio de unión que son complementarias de las secuencias de exón del gen dirigido, por tanto, preferentemente las secuencias exónicas del gen SLCO1B3.

Más preferido es un RTM de acuerdo con la presente invención, que tiene un dominio de unión que se une a una secuencia (selectivamente) es al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a la secuencia de nucleótidos entre los nucleótidos 1075 a 110 del intrón 3 de la secuencia genética de SLCO1B3, preferentemente entre los nucleótidos 1050 y 1100 del intrón 3 de la secuencia genética de SLCO1B3, más preferentemente entre los nucleótidos 1012 y 1118 del intrón 3 de la secuencia genética de SLCO1B3. Como también se ha descrito anteriormente, la secuencia de unión de acuerdo con el RTM de la presente invención en una realización preferida adicional tiene una secuencia modificada. La modificación en comparación con el dominio de unión original es el de los codones de inicio (al menos los que están en fase con la secuencia codificante del gen suicida) se retiran y/o cualquiera de los sitios de corte y empalme crípticos se retiran.

Una realización adicional de la invención se refiere a un RTM como se describe en el presente documento, en el que el RTM comprende adicionalmente al menos una secuencia segura en dicho dominio de corte y empalme y/o al menos una secuencia complementaria a las secuencias del exón vecinas. Dicha "secuencia segura" se incorpora en el espaciador, el dominio de unión, o en cualquier sitio del RTM para evitar el trans-empalme no específico. Estas es una región del RTM que cubre elementos del sitio de corte y empalme 3' y/o 5' del RTM por complementariedad relativamente débil, evitando el trans-empalme no específico. El RTM se diseña de tal manera que al hibridarse la parte de unión/direccionamiento del RTM, el sitio de corte y empalme 3' y/o 5' está descubierto y se vuelve totalmente activa. Dichas "secuencias seguras" comprenden uno o más tramos complementarios de la secuencia cis (o podría ser una cadena de ácido nucleico secundaria, distinta) que se une a uno o ambos lados del punto de ramificación del RTM, tracto de pirimidina, sitio de corte y empalme 3' y/ sitio de corte y empalme 5' (elementos de corte y empalme), o podría unirse a partes de los propios elementos de corte y empalme. Esta unión "segura" evita que los elementos de corte y empalme estén activos (es decir, bloquean U2 snRNP u otros factores de corte y empalme de la unión al RTM de elementos de reconocimiento del sitio de corte y empalme). La unión de la "secuencia segura" puede alterarse por la unión de la región de unión a la diana del RTM al pre-ARNm diana, exponiendo y activando de esta manera los elementos de corte y empalme de RTM (haciéndolos disponibles para el trans-empalme en el pre-ARNm diana).

Se prefiere adicionalmente un RTM de acuerdo con la presente invención, en el que la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm diana está mediada por complementariedad (es decir, basándose en el emparejado de bases características de los ácidos nucleicos), formación de triple hélice (como se describe, por ejemplo en Suzuki T. Targeted gene modification by oligonucleotides and small DNA fragments in eukaryotes. Front Biosci. 2008 Jan 1; 13:737-44. Review. Dang N, Klingberg S, Marr P, Murrell DF. Review of collagen VII sequence variants found in Australasian patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals nine novel COL7A1 variants. J Dermatol Sci. 2007 Jun; 46(3):169-78. Review), o interacción proteína-ácido nucleico (como se describe en la bibliografía respectiva).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un RTM de acuerdo con la presente invención, en el que el exón que se va a trans-empalmar comprende codones de parada introducidas artificialmente o de origen natural y/o una estructura formadora de ramificaciones con el fin de proporcionar un efecto tipo ARNi.

Se prefiere adicionalmente en el contexto de la presente invención que el RTM comprenda adicionalmente una 3' UTR que mejora la eficacia del trans-empalme, la expresión o estabilidad de ARN. Se pueden añadir características adicionales la molécula de RTM, tal como señales de poliadenilación para modificar la expresión/estabilidad del ARN, o secuencias de corte y empalme 5' para aumentar el corte y empalme, regiones de unión adicionales, regiones complementarias de auto-"seguridad", sitios de corte y empalme adicionales, o grupos protectores para modular la estabilidad de la moléculas y evita la degradación. Además, se pueden incluir codones de parada en la estructura de RTM para evitar la traducción de RTM no empalmados. Se pueden incorporar elementos adicionales tales como una estructura ahorquillada 3', ARN circularizado, modificación de bases nucleotídicas, o análogos sintéticos en los RTM para promover o facilitar la localización nuclear e incorporación empalmosómica, y estabilidad intra-celular.

El RTM de acuerdo con la presente invención es una molécula de ácido nucleico, tal como ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN, o una molécula análoga de un ácido nucleico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a un vector de expresión recombinante, que comprende un RTM de acuerdo con la presente invención como anteriormente. Un vector en el significado de la presente invención es un ácido nucleico que es capaz de introducirse o de introducir un ácido nucleico que comprende en una célula. Se prefiere que los RTM codificados por el ácido nucleico introducido se expresa en la células al introducir el vector. Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión eucariota, preferentemente un virus fabricado con secuencias derivadas de virus. Más preferido es un vector de la presente invención, en el que dicho vector comprende además elementos reguladores específicos de células cutáneas y preferentemente de queratinocitos con el fin de dirigir la expresión transgénica.

Los vectores de expresión adecuados para la expresión *in vitro* o *in vivo* se puede encontraren la bibliografía. Estos

vectores también se pueden modificar fácilmente por el experto en la técnica con el fin de aplicarse en los procedimientos de la presente invención. Los vectores de expresión contienen habitualmente todos los elementos genéticos que son necesarios para la producción de una molécula de RTM específica. En algunas realizaciones de la presente invención, los vectores de expresión de acuerdo con la presente invención pueden tener la forma de un "transgén" es decir, un elemento de expresión, por ejemplo, un vector adecuado que se diseña para la expresión y particularmente una expresión inducible y/o controlable *in vivo*. En consecuencia, el transgén comprende ácidos nucleicos de la presente invención junto con ciertos elementos de control para la expresión como se expone en el presente documento.

En una realización preferida, el vector de la presente invención comprende plásmidos, fagémidos, fagos, cósmidos, cromosomas de mamífero artificiales, construcciones de inactivación o inserción, virus, en particular adenovirus, virus vaccinia, lentivirus (Chang, L.J. y Gay, E.E. (2000) *Curr. Gene Therap.* 1: 237-251), virus del herpes simple (HSV-1, Carlezon, W.A. y col. (2000) *Crit. Rev. Neurobiol.*; 14(1): 47-67), baculovirus, retrovirus, virus adenoasociados (AAV, Carter, P.J. y Samulski, R. J. (2000) *J. Mol. Med.* 6: 17-27), rinovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), filovirus y versiones modificadas de los mismos (véase, por ejemplo, Cobinger G. P. y col (2001) *Nat. Biotechnol.* 19: 225-30), virosomas, liposomas con ADN "desnudo", y partículas revestidas de ácidos nucleicos, en particular esferas de oro. Son particularmente preferidos los vectores víricos como los vectores adenovíricos o vectores retrovíricos (Lindemann y col. (1997) *Mol. Med.* 3: 466-76 y Springer y col. (1998) *Mol. Cell.* 2: 549-58). Los liposomas son habitualmente vesículas unilamelares o multilamelares fabricadas de lípidos neutros, catiónicos y/o aniónicos, por ejemplo, por tratamiento con ultrasonidos suspensiones liposómicas. Las mezclas adecuadas de lípidos se conocen en la técnica y comprende, por ejemplo, colesterol, fosfolípidos tipo, por ejemplo, fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), y similares, DOTMA (1,2-Dioleiloxipropil-3-trimetilamonibromuro) y DPOE (Dioleoilfosfatidiletanolamina) que se pueden utilizar ambos en una variedad de líneas celulares. Las partículas revestidas de ácido nucleico son otros medios para la introducción de ácidos nucleicos en las células utilizando las llamadas "pistolas genéticas", que permiten la introducción mecánica de partículas en las células. Preferentemente las propias partículas son inertes, y por lo tanto, son en una realización preferida fabricadas con esferas de oro.

En realizaciones preferidas de la presente invención lo descrito en el presente documento comprende adicionalmente elementos reguladores específicos de células cutáneas y preferentemente queratinocitos, fibroblastos o células endoteliales para regular la expresión transgénica.

La presente invención también se refiere a una célula huésped transformada con una construcción de polinucleótido de la presente invención en un vector. La célula huésped puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas pueden preferirse como células huésped procariotas en algunas circunstancias y normalmente son un cepa de *E. Coli*, tal como, por ejemplo, la cepa DH5 de *E. Coli* disponible en Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, y RR1 disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Rockville, MD, USA (Nº de ATCC 31343). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen levaduras, insectos y células de mamífero, preferentemente células de vertebrado tal como las líneas celulares de colon y fibroblásticas de ratón, rata, mono o ser humano. Las células huésped de levaduras incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que están disponibles en general en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Las células huésped de mamífero preferidas incluyen las células ováricas de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC como CCL61, células embrionarias de ratón suizo NIH NIH/3T3 disponibles en la ATCC como CRL 1658, células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles en la ATCC como CRL 1650 y células 293 que son células embrionarias de riñón humano. Las células de insecto preferidas son células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovirus. Una revisión con respecto a la elección de las células huésped adecuadas para la expresión se pueden encontrar, por ejemplo, en el libro de texto de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Parte Uno, Segunda Edición, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por el experto. Las células huésped preferidas son células recombinantes, preferentemente una célula cutánea recombinante tal como un queratinocito, fibroblasto o células endotelial, que comprende una molécula de RTM o un vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención.

La transformación de las células huésped apropiadas con una construcción de ADN de la presente invención se consigue por procedimientos bien conocidos que dependen normalmente del tipo de vector que se utilice. Con respecto a la transformación de células huésped procariotas, véase, por ejemplo Cohen y col (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110, y Sambrook y col (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. La transformación de células de levadura se describe en Sherman y col (1986) *Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY. También es útil el procedimiento de Beggs ((1978) *Nature* 275, 104-109). Con respecto a las células de vertebrado, los reactivos útiles en la transfección de dichas células, por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE-dextrano o formulaciones liposómicas, están disponibles en Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USA. La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es bien conocido en la técnica para transformar células de levadura, células bacterianas, células de insecto y células de vertebrados.

Otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a una preparación farmacéutica, que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y la molécula RTM de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención, o la célula cutánea recombinante de acuerdo con la presente invención. Otro aspecto más de la presente invención se refiere entonces a una molécula de RTM de acuerdo con la

presente invención, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención, la célula cutánea recombinante de acuerdo con la presente invención, o la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención para su uso como un medicamento.

5 En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o un estado o que se enumera en la Farmacopea de EE. UU u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el sintetizado. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical sciences" by E. W. Martin.

10 En realizaciones específicas, las composiciones se administran: (1) en enfermedades o trastornos que implican la ausencia o la disminución (con respecto al normal o deseado) del nivel de una proteína endógena o función, por ejemplo, en huéspedes en los que la proteína está en falta, es deficiente genéticamente, biológicamente inactiva o infra reactiva, o bajo expresada; o (2) en enfermedades o trastornos en los que los ensayos, *in vivo* o *in vitro*, indican la utilidad de RTM sintéticos que inhiben la función de una proteína particular. La actividad de la proteína codificada por el ARNm quimérico resultante de la reacción de trans-empalme mediado por el RTM sintético se puede detectar fácilmente, por ejemplo, obteniendo una muestra del tejido del huésped (por ejemplo, de una biopsia de tejido) y se  
15 en *saya in vitro* en cuanto a los niveles de ARNm o proteína, estructura y/o actividad del ARNm quimérico que se expresa. Muchos procedimientos convencionales de la técnica que se pueden emplear de esta manera, incluyen pero no se limitan a inmunoensayos para detectar y/o visualizar la proteína codificada por el ARNm quimérico (por ejemplo, transferencia de western, inmunoprecipitación seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato dodecil sódico, inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la formación del ARNm quimérico de expresión detectando y/o visualizando la presencia del ARNm quimérico (por ejemplo, ensayos de Northern, transferencias de puntos, hibridación *in situ*, y PCR de transcripción inversa, etc.), etc. De manera alternativa, se puede llevar a cabo la visualización directa de un indicador genético codificado por el RTM sintético o asociado con un RTM.

25 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un RTM sintético o un ácido nucleico que codifique un RTM sintético, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área en necesidad de tratamiento. Esto se puede conseguir, por ejemplo, y sin que sea a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, en conjunción con un vendaje después de la cirugía, por inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas tales como membranas sialásticas, o fibras. U otro sistema de suministro de fármacos con liberación controlada, tal como nanopartícula, matrices tales como polímeros de liberación controlada, hidrogeles. El RTM o RTM sintético se administrará en cantidades que son eficaces para producir el efecto deseado en la célula dirigida. Las dosificaciones eficaces de los RTM sintéticos se  
30 pueden determinar mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica que se dirigen a parámetros tales como la semivida biológica, biodisponibilidad y toxicidad. La cantidad de la composición de la invención que será eficaz dependerá de la naturaleza de la enfermedad o trastorno que se vaya a tratar y se puede determinar por técnicas clínicas convencionales. Además, los ensayos *in vitro* puede emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación.

40 La presente invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más envases cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención opcionalmente asociadas con dicho envase(s) puede haber una nota en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuya nota refleje la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración humana.

45 Cualquier molécula de la invención, ácido nucleico, vector de expresión, o célula es útil para el tratamiento de los trastornos como se ha descrito en el presente documento. Por lo tanto, cualquier molécula de la presente invención se puede utilizar como un medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede utilizarse por sí mismo o combinado con otra molécula(s) de la invención o (una) molécula(s) conocida.

50 Preferentemente, el medicamento de la presente invención se puede administrar directamente al paciente, en el órgano afectado o sistémicamente i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v., o se aplica *ex vivo* a las células derivadas del paciente o una línea celular humana que se administra posteriormente al paciente, o se utiliza *in vitro* para producir células recombinantes que se re-administra entonces al paciente. En realizaciones preferidas de la invención, posteriormente a la administración del RTM de acuerdo con la invención, se administra un profármaco para iniciar la destrucción de las células diana.

55 El aminoácido de la invención puede estar sustancialmente puro, o estar contenido en un vector adecuado o sistema de suministro. El ácido nucleico puede ser un ADN, ADNc, ANP, ARN o una combinación de los mismos. Los procedimientos para diseñar e introducir dicho ácido nucleico son bien conocidos en la técnica. Una revisión se proporciona por ejemplo en Pascolo S. 2006; Stan R. 2006, o A Mahdavi 2006 (véase Mahdavi A, Monk BJ. Recent advances in human papillomavirus vaccines. Curr Oncol Rep. 2006 Nov; 8 (6): 465-72. Stan R, Wolchok JD, Cohen AD. DNA vaccines against cancer. Hematol Oncol Clin North Am. 2006 Jun; 20(3): 613-36. Pascolo S. Vaccination  
60

with messenger RNA. *Methods Mol Med.* 2006; 127:23-40). Las vacunas de polinucleótidos se preparan fácilmente, pero el modo de acción de estos vectores en la inducción de una respuesta inmunitaria no se comprende del todo. Los vectores adecuados y sistemas de suministro incluyen el ADN y/o ARN vírico, tales como los sistemas basados en adenovirus, virus vaccinia, retrovirus, herpesvirus, virus adenoasociados, o híbridos que contienen elementos de más de un virus. Los sistemas de suministro no víricos incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos en la técnica del suministro de ADN. El suministro físico, tal como mediante una "pistola genética", se puede utilizar también.

La presente invención proporciona de esta manera un medicamento que es útil en el tratamiento de trastornos de la piel u otros epitelios tales como la epidermólisis bullosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, enfermedades autoinmunitarias, tales como psoriasis o neurodermitis, y cánceres de la piel.

Se desvela el uso de un RTM de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión recombinante de acuerdo con la presente invención, la célula cutánea de acuerdo con la presente invención, o la preparación farmacéutica de acuerdo con la presente invención para el tratamiento de una enfermedad que se selecciona de entre trastornos de la piel u otros epitelios tales como epidermólisis bullosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, enfermedades autoinmunitarias tales como psoriasis o neurodermitis, y cánceres de piel. Se desvela el uso de acuerdo con la presente invención, en el que dicho medicamento se aplica en la piel.

La presente formulación es la que es adecuada para la administración del principio activo respectivo, en particular un RTM de la presente invención por cualquier vía aceptable tal como tópica, oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Preferentemente la administración es s.c., y más preferentemente tópica. La administración puede ser por una bomba de infusión.

Las enfermedades preferidas que se van a tratar con la presente invención son enfermedades proliferativas, preferentemente enfermedades cancerosas tales como cánceres de la piel, más preferentemente carcinoma de células escamosas; o una enfermedad seleccionada de entre trastornos genéticos de la piel y del epitelio, tal como epidermólisis bullosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, enfermedades inmunológicas, tales como la psoriasis o neurodermitis.

Por lo tanto, un aspecto adicional que se desvela pertenece a un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad como se ha descrito anteriormente en el presente documento. El procedimiento de tratamiento implica la administración de una molécula de RTM que necesita dicho tratamiento, y posteriormente la administración de un profármaco. El profármaco penetrará en las células en las que se produce la reacción de trans-empalme iniciando la muerte celular o mediante un gen suicida.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, independientemente, sin limitarse a estas. En las Figuras y Secuencias,

Figura 1: Evaluación de un dominio de unión (BD) específico para el trans-empalme eficaz. (A) Diagrama esquemático del procedimiento de exploración utilizado para la evaluación de los BD. (B) posición de unión de RTM\_1 en el intrón diana 3 de SLCO1B (nt 1012-nt 1118). (C) Análisis de la expresión de AcGFP por citometría de flujo en células HEK 293 transfectadas con la molécula diana, RTM\_1, o la molécula diana + RTM\_1. Exclusivamente las células co-transfectadas con la molécula diana y RTM\_1 mostraban una señal de fluorescencia verde debido a la fusión de ambas partes de empalme de AcGFP por el ARN de trans-empalme.

Figura 2: (A) Construcciones utilizadas en el procedimiento experimental. (B) Diagrama esquemático del sistema de transfección doble utilizado para la evaluación de RTM. El trans-empalme correcto del RTM al SLCO1B3-M da como resultado un ARNm de fusión que consiste en el exón de SLCO1B3 y TK.

Figura 3: Expresión y actividad del gen suicida de la construcción de fusión SLCO1B3-TK. (A) Análisis de transferencia de Western de células HEK293AD 48 h después de la transfección con HSV-TK (37 kDa) o fusión SLCO1B3-TK (40 kDa). Las células sin tratar servían como control negativo y una  $\alpha$ -actinina (1003 kDa) se utilizó como control de carga. (B) Se llevó a cabo un ensayo MTT para analizar la funcionalidad de la proteína de fusión SLCO1B3-KT expresada que representa el producto creado por ARN de trans-empalme entre SLCO1B3-M y el TK-RTM. La viabilidad celular se presenta como el porcentaje relativo a células HEK293AD sin transfectar.

Figura 4: Detección de trans-empalme. (A) Análisis SqRT-PCR de células HEK293AD transfectadas doblemente con el SLCO1B3-M y RTMorg (1), RTMm1 (2), RTMm2 (3). Se muestra el producto PCR de la fusión del ARNm de SLCO1B3 y HSV-TK (205 pb). Se utilizó el GAPDH como gen constitutivo. Los productos PCR se verificaron por secuenciación directa, demostrando el trans-empalme correcto entre SLCO1B3-MG y los RTM. (B) Análisis de transferencia de Western de células HEK293AD únicas y co-transfectadas. La tinción con  $\alpha$ -actinina (100 kDa) servía como control de carga.

Figura 5: (A) Se llevó a cabo el ensayo MTT para medir la reducción en la viabilidad celular. Se transfectaron 100 ng de cada RTM así como diferentes concentraciones de la SLCO1B3-M (100 ng, 500 ng, 1000 ng)

5 en células HEK293AD y se trataron con 100 mM. Las células HEK293AD, transfectadas con SLCO1B3-MG solo, la fusión SLCO1B3-TK o HSV-TK servían como controles negativos y positivos, respectivamente. Se muestra la media  $\pm$  SD de dos experimentos independientes. Se midieron seis replicados de cada muestra en cada experimento. El porcentaje de viabilidad celular se calculó por la ecuación:  $(DO\ GCV\text{-tratado}/DO\ GCV\text{ sin tratar}) \times 100 / \text{control negativo } (DO\ GCV\text{-tratado} / DO\ GCV\text{-sin tratar})$ . (B) Detección de muerte celular *in situ* por el ensayo TUNEL de células HEK293AD tratadas con RTMm2 y RTMm2+MG se evaluó por análisis citométrico de flujo. La fusión SLCO1B3-TK servía como control positivo en el experimento. Se muestra la sobrecarga de células positivas a rojo TMR. La línea negra representa las poblaciones celulares GCV sin tratar y la línea roja las GCV tratadas. (C) La tinción con rojo TMR de las células apoptóticas se muestra por análisis de microscopía de fluorescencia. El descenso del número de células se visualizó por análisis de microscopía óptica.

Figura 6: Alineamiento de secuencia de los diferentes RTM; RTMorg, RTMm1 y RTMm2.

15 La SEQ ID NO: 1 muestra parte de la secuencia del RTMorg utilizada en el alineamiento de la Figura 6.  
 La SEQ ID NO: 2 muestra parte de la secuencia del RTMm1 utilizada en el alineamiento de la Figura 6.  
 La SEQ ID NO: 3 muestra parte de la secuencia de RTMm2 utilizada en el alineamiento de la Figura 6.  
 La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia del dominio de unión de RTMorg.  
 La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia del dominio de unión de RTMm1.  
 La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia del dominio de unión de RTMm2.  
 20 La SEQ ID NO: 7 a 16 muestran secuencias de cebador.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Exploración de un dominio de unión de RTM eficaz

25 Una exploración de un dominio de unión (BD) ayuda a acelerar la construcción de un RTM altamente eficaz con fines endógenos. Utilizando el procedimiento de exploración de RTM basado en fluorescencia, los inventores fueron capaces de seleccionar un BD específico para el intrón 3 de SLCO1B3 de entre un agrupamiento de BD creados aleatoriamente con distintas localizaciones de unión en el intrón diana. En total, se ensayaron 38 RTM 3' individuales en cuanto a su eficacia de trans-empalme por análisis de citometría de flujo después de la co-transfección con la molécula diana diseñada en células HEK293AD (datos no mostrados). La unión del RTM específica el intrón 3 de la molécula diana induce la fusión entre ambas partes de la secuencia de corte y empalme de AcGFP por el ARN de trans-empalme 3', manifestado por la expresión del indicador de longitud completa en las células co-transfectadas. La intensidad de la señal de fluorescencia y la cantidad de AcGFP que expresan las células se correlaciona con la eficacia del trans-empalme del RTM transfectado (Fig. 1A). El análisis revelaba que el RTM\_1 (posición de unión en el intrón 3: nt 1012-nt 1118) como uno de los RTM más eficaces y por lo tanto se seleccionó para los ensayos iniciales en el sistema de muerte celular inducible basado en timidina cinasa (Fig. 1B+C).

### 35 Ejemplo 2: Trans-empalme entre SLCO1B3-MG y TK-RTM

Para evaluar adicionalmente la especificidad de los RTM en una estrategia de terapia con genes suicidas los inventores clonaron el BD del RTM\_1 en el plásmido RTM suicida que contiene la secuencia timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple. La secuencia corriente arriba del dominio de corte y empalme se mutó con el fin de reducir el 40 los sitios de corte y empalme crípticos potenciales y los codones de inicio, dando resultado 3 RTM diferentes denominados RTMorg, RTMm1 y RTMm2. Una detallada información de las modificaciones de secuencia de los RTM se proporciona en la Figura 6.

Para imitar la situación RDEB-SCC endógena en las células HEK 293 experimentales, los inventores diseñaron un vector minigén (MG) que albergaba el exón 3 del gen del marcador tumoral SLCO1B3 así como las primeras 1.200 bases del intrón 3. Los vectores que expresaban HSV-TK y SLCO1B3-T servían como controles positivos del procedimiento experimental (Fig. 2A). En la Figura 2B se muestra un diagrama esquemático del sistema de transfección doble. Con el trans-empalme correcto del RTM con el pre-ARNm MG, se genera un ARNm de fusión del exón 3 de SLCO1B3 y la HSV-TK, que codifica una proteína de fusión que es aproximadamente 3 kDa mayor que la HSV-TK original.

### 45 Ejemplo 3: la proteína de fusión de SLCO1B3-TK presenta actividad genética suicida

50 Antes de las investigaciones con el TK-RTM los inventores determinaron si la proteína de fusión, que resulta de la reacción de trans-empalme entre SLCO1B3-MG y el TK-RTM, se expresa correctamente y si aún posee su funcionalidad como gen suicida. En este extremo, los inventores crearon el ADNc quimérico del exón 3 de SLCO1B3 y el HSV-TK y se confirmó su expresión en lisado celulares completos de células HEK293AD por análisis de transferencia de Western (Fig. 3A). La proteína de fusión SLCO1B3-TK se detectó con el peso molecular previsto de 40 kDa, 3 kDa mayor que la HSV-TK (37 kDa). Además, se evaluó la actividad biológica de la proteína de fusión SLCO1B3-TK en un ensayo de viabilidad celular MTT (Fig. 3B). Las células HEK293AD se transfectaron con el plásmido HSV-TK o la construcción de fusión y se trataron con GCV. Por lo tanto estos datos confirmaban la funcionalidad del a construcción de fusión, que también resultará del procedimiento de trans-empalme en el cuadro

experimental.

#### Ejemplo 4: Detección de la fusión SLCO1B3 en el ARNm y a nivel proteico

Para investigar el trans-empalme preciso entre el SLCO1B3-MG y cada RTM individual los inventores primeros llevaron a cabo una sqRT-PCR. Los inventores detectaban el ARNm de fusión correcto en las 3 poblaciones celulares co-transfectadas representadas por un producto de PCR de 205 pb que se muestra en gel de agarosa (Fig. 4A). De manera interesante, no se observaba una diferencia significativa en la cantidad de expresión (datos no mostrados). Además los inventores llevaron a cabo el análisis de transferencia de Western para confirmar el producto del trans-empalme también a nivel proteico. Como se muestra en la Figura 4B los inventores mantenían una alta expresión de fondo de HSV-TK en células transfectadas con el RTMorg en contraste con los RTM mejorados RTMm1 y m2. Además, la doble transfección de la diana y cada RTM individual revelaba que el RTMorg presentaba la construcción de fusión trans-empalmada (40 kDa) así como la proteína HSV-TK de fondo (37 kDa). Sin embargo, apenas se observaba expresión de fondo del HSV-TK en células transfectadas con RTMm1 y RTMm2 y seguía produciéndose la proteína de fusión trans-empalmada. Estos datos indican que la mejora de RTM por la optimización de la secuencia es importante con el fin de reducir la expresión no deseada de HSV-TK.

#### Ejemplo 5: Inducción del gen suicida por el ARN de trans-empalme

La metodología SMarT basada en ARN proporciona especificidad genética y celular, reduciendo de esta manera los efectos secundarios no deseados que acompañan otras estrategias de muerte celular mediada por toxinas. La muerte celular se induce principalmente en células que expresan el gen marcador tumoral SLCO1B3 no regulado. La expresión de las construcciones de fusión a nivel proteico, que se muestra en la Figura 4B, se correlaciona también con la viabilidad medida en el ensayo MTT (Fig. 5A). La transfección sencilla de RTMorg ya demostraba la inducción de apoptosis en células HEK293AD, que se explica por codones de inicio alternativos (ATG) y sitios de corte y empalme corriente arriba y en el BD. Debido a este hecho, las proteínas TK en fase alternativas se expresaban probablemente a partir del vector RTM que daba lugar a un efecto de toxicidad del RTM solo en células tratadas. Además la co-transfección de RTMorg y el SLCO1B3-MG mostraba una baja reducción de la viabilidad celular indicando reducidos efectos de trans-empalme. Sin embargo, la eliminación de los ATG y sitios posibles de corte y empalme crípticos en y corriente arriba de la secuencia del BD del RTM por mutagénesis dirigida al sitio reducía significativamente los efectos secundarios mediados por RTM. El RTMm1 y RTMm2 demostraban solo una mínima capacidad para inducir apoptosis utilizando 100 mg de plásmido/transfección. Además, la adición de diferentes cantidades del SLCO1B3-MG (100 ng, 500 ng, 1000 ng) daba lugar a la fusión del exón 3 de SLCO1B3 del MG con la TK o del RTM por trans-empalme e inducía la expresión de una proteína de fusión SLCO1B3-TK funcional en las células transfectadas. Tanto RTMm1 como RTMm2 inducían un claro descenso de la viabilidad celular después de la adición de MG de una manera dependiente de la dosis. Adicionalmente, la transfección de los plásmidos que expresaban la HSV-TK y la proteína de fusión SLCO1B3-TK demostraba una clara reducción de la viabilidad celular en comparación con las células HEK293AD transfectadas exclusivamente con MG (Figura 5A).

El ensayo TUNEL llevado a cabo en las células HEK293AD transformadas subrayaba la fiabilidad y funcionalidad del sistema de muerte celular inducible mediante construcciones de trans-empalme (Fig. 5B). La co-transfección de SLCO1B3-MG (1 µg) y RTMm2 (100 ng) en células HEK293AD inducía apoptosis en hasta un 63,8 % de las células revelada por citometría de flujo. Este resultado es comparable con la tasa de letalidad de las células que alcanzaba con el vector de control de fusión SLCO1B3-TK. La microscopía de fluorescencia en las células co-transfectadas con SLCO1B3-MG y RTMm2 revelaba un aumento de tinción roja TMR, que se correlacionaba con la disminución de células sanas (microscopía óptica) en comparación con células transfectadas solo con RTMm2.

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

### Construcciones de exploración de RTM

Molécula diana SLCO1B3: La molécula diana albergaba la región codificante 5' AcGFP (nt 1- nt 336), un sitio de corte y empalme 5' funcional (ag/gtaag) y los nucleótidos 4-1200 (los primeros 3 nucleótidos del intrón 3 se retiraron para evitar la creación de un posible competidor 5'ss) del intrón 3 de SLCO1B3. La parte del intrón 3 se amplificó por PCR utilizando la Gotaq ADN polimerasa (Promega), el ADN genómico de un donante sano y un par de cebadores específicos del intrón (dir: 5'-gatcgatatcgaatgggttttatatttcaactaaaataagttaatggaaaattttt-3', (SEQ ID NO. 7; inv: 5'-gagagcgccgcgattgaatatactctcaaaagaagacatacaaatagc-3' SEQ ID NO. 8) que inserta los sitios de restricción para la clonación. el producto PCR se ligó en el vector de expresión pcDNA 3.1D/V5-His-TOPO corriente abajo de la secuencia 5' AcGFP utilizando los sitios de restricción para EcoRV y NotI. Se llevaron a cabo las extracciones en gel de los productos amplificados por PCR utilizando el kit GFX™ PCR DNA y Purificación en banda de gel (GE Healthcare). Las preparaciones plasmídicas se llevaron a cabo utilizando el kit Plasmid Mini Prep de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se llevó a cabo el análisis de secuencia de todos los plásmidos y los productos de PCR utilizando el secuenciador automático 3130 ABI Prism y los kits de secuenciador de ciclo terminador de colorante ABI PRISM (Applied Biosystems)

Molécula de ARN de trans-empalme: La matriz del RTM consiste en un dominio de corte y empalme, que tiene una corta región espaciadora y elementos de corte y empalme 3' (punto de ramificación, tracto de polipirimidina, sitio

receptor de empalme 3') para el corte y empalme eficaz, y un dominio codificante incorporado por la secuencia codificante 3' omitida de AcGFP (nt 337-nt 720) y el gen DsRED de longitud completa que se expresa bajo el control transcripcional de un sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES) [14-19]. Se llevó a cabo la creación de una biblioteca de RTM altamente diversa para el intrón 3 de SLCO1B3 de acuerdo con Bauer y col. (Bauer y col. 2012 in press, wird noch eingefügt). El procedimiento de clonación de la biblioteca del dominio de unión (BD) incluye la amplificación de la porción del intrón 3 de SLCO1B3, la fragmentación de los productos de PCR por sonicación (~ 10 min en hielo) y finalmente la clonación de los fragmentos con el extremo reparado terminales (DNATerminator® End Repair Kit, Lucigen Corporation) en el vector RTM, corriente arriba del dominio de corte y empalme utilizando el sitio de restricción para HpaI.

#### 10 Construcciones para el sistema de muerte celular inducible basado en HSV-TK

Minigén SLCO1B3: Para simular el escenario de trans-empalme endógeno lo más parecido posible se construyó un minigén SLCO1B3 (SLCO1B3-MG), que consiste en el primer exón codificante de SLCO1B3 (exón 3: 84 nucleótidos) y las primeras 1200 bases del intrón 3 debido al tamaño enorme del intrón entero (39.205 nucleótidos). La región exón/intrón 3 de SLCO1B3 se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de un donante sano utilizando Gotaq ADN polimerasa (Promega) y un par de cebadores específicos (dir: 5'-gatcaagcttatggaccaacatcaacattggaataaaacagc-3' SEQ ID NO. 9, inv: 5'-gagagcgccgctgattgaatatacattctcaaaagaagacatacaaatagc-3' SEQ ID NO. 10). El producto de PCR resultante se clonó en el vector pcDNA 3.1D/V5-His-TOPO (Invitrogen) utilizando los sitios de restricción para HindIII y NotI.

TK-RTM: En primer lugar el dominio de unión (BD) más eficaz, evaluado en el sistema de exploración basado en fluorescencia, se clonó en el vector pIRES2-AcGFP1 (Clontech) junto con los elementos de corte y empalme 3' utilizando los sitios de restricción para EcoRI y PstI. La secuencia codificante (CDS) de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) sin el codón de inicio se amplificó a partir de vector de direccionamiento HAX-1, amablemente proporcionado por el Dr. Peckl-Schmid [20]. Antes de la amplificación por PCR se mutó el sitio de restricción PstI de la CDS de HSV-TK utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning (Stratagene), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los inventores utilizando un cebador directo incluyendo un PstI (5'-ctagctgcagcccacgctactgctggttga-3' SEQ ID NO. 11), un cebador inverso incluyendo el sitio de restricción BamHI (5'-gagagaggatcctcagttagctccccatctc-3' SEQ ID NO. 12) y Pfu turbo polimerasa (Stratagene) para la amplificación por PCR. El producto de PCR resultante se subclonaron adicionalmente en un vector RTM.

Para la optimización del RTM, se modificaron los codones de inicio y los sitios de corte y empalme críticos potenciales corriente arriba del dominio de corte y empalme con el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning (Stratagene) dando como resultado tres RTM diferentes: RTMorg, RTMm1 y RTMm2. La secuencia de cada construcción se proporciona en los datos suplementarios 1.

Control positivo: Como control positivo servía un plásmido que expresa la proteína de fusión de SLCO1B3 y el HSV-TK (SLCO1B3-TK de fusión) que representa el producto de trans-empalme preciso entre TK-RTM y el SLCO1B3-MG. Aquí el exón 3 del SLCO1B3 se amplificaba a partir del SLCO1B3-MG utilizando la Pfu turbo polimerasa y los siguientes cebadores (dir: 5'-gagagaattcatggaccaacatcaacattt-3', SEQ ID NO. 13; inv: 5'-ctagctgcagcttgaatcattgca gctc-3', SEQ ID NO. 14). El producto de PCR se clonó adicionalmente en el vector RTM-TK utilizando sitios de restricción EcoRI y PstI, retirando de esta manera el dominio de unión y de corte y empalme del TK-RTM. Finalmente, el sitio de restricción PstI restante se retiró a partir del CDS utilizando el kit de mutagénesis dirigido al sitio QuikChange Lightning (Stratagene).

#### Cultivo celular y transfección

Para todos los experimentos de exploración, se utilizó la línea celular de riñón embrionario humano HEK293AD (Stratagene). Las células HEK293AD se cultivaron en DMEM suplementado con un 10 % de FCS y 100 U/ml de penicilina/estreptomina (Biochrom) a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub> en una incubadora humidificada. Las células se pasaron cada 4 días por un tratamiento con tripsina-EDTA (Biochrom) seguido por centrifugación a 250 g durante 5 min. A continuación las células se sembraron en nuevas placas de cultivo celular a la densidad deseada para alcanzar un 60 % de confluencia al día siguiente de la transfección con el plásmido. Las células se transfectaron utilizando el activo jetPEI (Polyplus-transfection SA, Illkirch, France) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

#### Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

Las células HEK293AD se consideraron para el aislamiento de ARN dos días después de la transfección utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 1 µg de ARN purificado era digerido por DNasa I durante 30' a TA seguido por la síntesis de ADNc utilizando el kit de síntesis iScriptTMcDNA (Biorad). Para la síntesis de ADNc se proporcionó una mezcla de oligo(dT) y cebadores hexaméricos aleatorios.

#### SqRT-PCR

Se llevó a cabo la sqRT-PCR para detectar las transcripciones de fusión SLCO1B3-TK en células HEK293AD co-transfectadas con SLCO1B3-MG y TK-RTM. Para el análisis PCR se incluyeron un cebador directo específico de SLCO1B3 (5'-ggaccaacatcaacattggaataaaacagca-gag-3' SEQ ID NO. 15), un cebador inverso específico de HSV-TK

(5'-gtaagtcacgcgctcgggta-3' SEQ ID NO. 16), un ADNc de células HEK293AD tratadas y GoTaq®qPCR Master Mix (Promega). La PCR se llevó a cabo bajo las mismas condiciones con un sistema Biorad CFX96TM: 95 °C durante 2 min, 40 ciclos de 20 s a 95 °C, 20 s a 64 °C y 20 s a 72 °C. El experimento se llevó a cabo por duplicado y se repitieron dos veces- Los productos de la PCR correctos se verificaron por secuenciación directa.

5 Análisis de transferencia de Western

Para la inmunotinción de la proteína de fusión SLCO1B3-TK, se re-suspendieron células HEK293AD en tampón de lisis RIPA (Santa Cruz) y las proteínas extraídas se separaron en un gel NuPAGE 4-12 % Bis Tris (1,0 mm x 12 pocillos, Invitrogen) en condiciones desnaturalizantes durante 2 horas a 120 Volt. Tras el equilibrado del gel SDS en tampón de transferencia convencional durante hasta 30 min a TA las proteínas se electro transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybon-ECL, GE Healthcare) durante 75 min a 0,25 Amperios. Posteriormente, la membrana se empapó en tampón de bloqueo (5 % de leche en polvo en TBS-T) durante 1 hora a TA y se incubó durante una noche a 4 °C con los primeros anticuerpos: IgG de cabra anti-HSV-TK (diluido 1:1000 en TBS-T) (Santa Cruz Biotechnology) e IgG de conejo anti- $\alpha$ -actinina (diluido 1:000-1:5000 en TBS-T) (Santa Cruz Biotechnology) Después de tres etapas de lavado con TBS-T, la membrana se incubó con los anticuerpos policlonales secundarios de conejo anti-HRP de cabra (diluido 1:1000 en TBS-T, Dako) y anticuerpo Envision anti-conejo marcado con HRP (diluido 1:500 en TBS-T, Dako), respectivamente. La transferencia se lavó tres veces y se llevó a cabo la visualización de las bandas de proteína específicas utilizando el kit Immun-Star WesternC (Biorad) y un ChemiDoc XRS Imager (Biorad).

Ensayos de viabilidad celular

20 La viabilidad celular después del tratamiento con RTM se evaluó por el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma). 48 h después de la transfección con RTM, se sembraron las células HEK296AD en una placa de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) y se trataron con 100  $\mu$ M de GCV (Cymevene® Roche el día después durante 72 horas. Se añadieron 20  $\mu$ l de MTT (5 g/l en PBS) a cada pocillo (200  $\mu$ l) y se incubó durante aproximadamente 2 horas a 37 °C. Entonces, se retiraron todos los medios y las células se lisaron con 100  $\mu$ l de DMSO/glicina (6 Vol. DMSO + 1 Vol. 9,1 M glicina/NaOH, pH 10,2). Después de 10 min de incubación en un agitador de placas (500 rpm) se midió la absorbancia del producto formazan resultante a 492 nm /620 nm con un fotómetro de placas (Tecan). El porcentaje de viabilidad celular se calculó por la ecuación: (DO GCV-tratado/DO GCV no tratado) x100/control negativo (DO GCV-tratado/DO GCV no tratado). Las células HEK293AD transfectadas solo con el SLCO1B3-MG servía como control negativo en este ensayo.

30 Ensayo de Marcado de final de corte de dUTP de Terminal desoxinucleotidil transferasa (TUNEL)

La detección de apoptosis se llevó a cabo utilizando el kit de detección de muerte celular *in situ*, TMR rojo (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, las células se lavaron con 1x PBS, se fijaron con un 2 de paraformaldehído durante 60 min a TA y se permeabilizó con un 0,1 % de BSA /0,2 % de Triton X-100 en PBS durante 5-10 min en hielo. Después de 3 etapas de lavado las células se incubaron con solución de reacción TUNEL durante 1 h a 37 °C en oscuridad y finalmente se analizó por microscopía de fluorescencia (Axiophot, Carl Zeiss) y por citometría de flujo (FC500, Beckman Coulter).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Bauer, Johann
- <120> Una molécula de ARN de trans-empalme (RTM) para su uso en el tratamiento del cáncer
- <130> B31051WO
- 45 <150> GB1219762.0
- <151> 02-11-2012
- <160> 16
- 50 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1152
- <212> ADN
- 55 <213> artificial
- <220>
- <223> RTMorg
- 60 <400> 1

ES 2 652 143 T3

```

gggtaagsgg caagggtcga acagagrgcg cagcaggagc tcaggggaaa cgctggtatc      60
ttatagttct gtccggggtt cgcactctga cttgagcgtc gatthttgtga tgctcgtcag      120
gggrgaggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttcc tggcctttgc      180
tggccttttg ctcacatggt ctttctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta      240
ccgccatgca ttagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat      300
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac      360
ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc      420
cattgaocgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg      480
tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg ctaaattggc cgctggcat      540
tatgccagtc acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc      600
atcgttatta ccatggtgat gcgggttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt      660
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac      720
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccattgac gcaaattggc      780
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctg gtttagtgaa ccgtcagatc      840
cgctagcgtc accggactca gatctcagac tcaagcttcg aattcatcga tgttagaat      900
gcaaataaat actacaatga gatgctatct caccocagc taaaatggct tatatcccaa      960
agacaggcaa taacaaatgc tgggtgaggt gtggagtaaa aacgagaaca ttattatagc     1020
gttgctcagag tactaactgg tacctcttct ttttttctg cagcccacgc tactgcccgt     1080
ttatatagac ggtccccacg ggatggggaa aaccaccacc acgcaactgc tgggtggccyt     1140

igtcsqsgsr ra                                                                1152

```

- 5 <210> 2
- <211> 1196
- <212> ADN
- <213> artificial
- 10 <220>
- <223> RTMm1
- <400> 2

ES 2 652 143 T3

tcgraaacym atgagaagag kcgccaacga gagggagctt ccaaggggaa acgcctggwa 60  
 tcttatagtc gtgtcagaga tttggcmaact tctgacctga aggmktcgat tttytgtgat 120  
 gctcgtcaag gaggrgcgga agcctatgaa aaaacgcccc gcaacgcggc tttttacggg 180  
 ttckkggct tttgctggcc ttttgcctac awggttcttt cctgogttat cccctgattc 240  
 tgtggataac cgtattaccg ccatgcatta gttattaata gtaatcaatt acgggggcat 300  
 tagttcatag cccatataat gagttccgag ttacataact tacggtaaat ggccgcctgg 360  
 ctgaccggcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa 420  
 cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact 480  
 tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc tattgacgtc aatgacgcta 540  
 aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt 600  
 acatctacgt attagtcatc gctattacca tgggtgatgag gttttggcag tacatcaatg 660  
 ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg 720  
 ggagtttggt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc 780  
 cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctgggt 840  
 tagtgaaccg tcagatccgc tagcgtacc ggactcagat ctcgagctca agcttcgaat 900  
 tcatcgattt tagaaatcca aatcaatact acaattagat cctatctcac ccccagttaa 960  
 aatcgcttat atcccaaaga caggcaataa caaatcctgg gggggggtgt ggagcaaaaa 1020  
 cgaggaattc gttaacgata tcgagaacat tattatagcg ttgctcgagt actaactggt 1080  
 acctcttctt tttttctgc agcccacgct actgcggggt tatatagacg gtccccacgg 1140  
 gatggggaaa accaccacca cgcaactgct ggtkgcccct ggttsgcsm rcmrrt 1196

<210> 3  
 <211> 1186  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> RTMm2

<400> 3

acgagmtrgg ttcsgaatma gagrargsgc aacgaaggag cttcagggaa cgcttgwtc 60

ES 2 652 143 T3

ttatagtccc tgtccgrgtt cgccacctcc tgacttgaag cgtcgatttt tgtgatgstc 120  
 gtcaagrgrg gscggaagcc tatggaaaaa acgcagcaac ggggcctttt ttacggttcc 180  
 tggcctttks tggcctttgc tcacatgttc tttctgogtt atccctgatt ctgkkgataa 240  
 ccgtattacc gccatgcatt agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 300  
 gccccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg 360  
 cccaacgacc cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata 420  
 gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta 480  
 catcaagtgt atcatatgcc aagaacgccc cctattgacg acaatgacgg aaaatggccc 540  
 gcctggcatt atccccagta catcacctta tcggactttc ctacttggca gtacatctac 600  
 gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga 660  
 tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg 720  
 ttttggcacc aaaatcaacg ggactctcca aaatttcgta acaactccgc ccattgacg 780  
 caaatcggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg ttagttaac 840  
 cgtcagatcc gctagcgcta cggactcag atctcgagct caagcttoga attcatcgat 900  
 tttagaaatc caaatcaata ctacaattag atcctatctc acccccagtt aaaatcgctt 960  
 atatcccaaa gacaggcaat aacaaatcct ggggggggtt gtggagcaaa aacgaggaat 1020  
 tcgttaacga tatcgagaac attattatag cgttgctoga gtactaactg gtacctcttc 1080  
 tttttttct gcagcccacg ctactgoggg tttatataga cggtcccac gggatgggga 1140  
 aaaccaccac cacgcaactg ctggtggcct ggtcgcgmsr amysag 1186

5 <210> 4  
 <211> 107  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> BD de RTMorg  
 <400> 4

agaaatgcaa atcaatacta caatgagatg ctatctcacc cccagttaa atggcttata 60  
 tcccaaagac aggcaataac aaatgctggt gaggttgtgg agtaaaa 107

15 <210> 5  
 <211> 108  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> BD de RTMm1  
 <400> 5

ES 2 652 143 T3

**agaaatccaa atcaatacta caattagatc ctatctcacc cccagttaa atcgcttata** 60  
**toccaaagac aggcaataac aaatcctggg gggggttggtg gagcaaaa** 108  
 5 <210> 6  
 <211> 108  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> BD de RTMm2  
 <400> 6  
**agaaatccaa atcaatacta caattagatc ctatctcacc cccagttaa atcgcttata** 60  
**toccaaagac aggcaataac aaatcctggg gggggttggtg gagcaaaa** 108  
 15 <210> 7  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> Cebador  
 25 <400> 7  
 gatcgatc gaatgggtt tatatttca aactaaata agttaatga aaatttt 58  
 30 <210> 8  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 8  
 gagagcggc gcgattgaa tatacatctc tcaaagaag acatacaaat agc 53  
 45 <210> 9  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador  
 55 <400> 9  
 gatcaagct atggaccaac atcaacatt gaataaaca gc 42  
 60 <210> 10  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 55 <400> 10  
 gagagcggc gcgattgaa tatacatctc tcaaagaag acatacaaat agc 53  
 60 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN

ES 2 652 143 T3

<213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 5  
 <400> 11  
 ctagctgcag cccacgctac tgcgggtta 30  
 <210> 12  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Cebador  
 15  
 <400> 12  
 gagagaggat cctcagttag cctccccat ctc 33  
 20  
 <210> 13  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 13  
 gagagaattc atggaccaac atcaacattt 30  
 30  
 <210> 14  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 14  
 ctagctgcag ctggaatcca ttgcagcgtc 30  
 40  
 <210> 15  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 15  
 ggaccaacat caacatttga ataaaacagc agag 34  
 50  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador  
 60  
 <400> 16  
 gtaagtcatc ggctcgggta 20

## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ARN de trans-empalme (RTM), que comprende al menos un dominio de unión que es complementario de un pre-ARNm de un gen asociado con un tumor, al menos un dominio de corte y empalme y al menos un dominio codificante, **caracterizado porque** el dominio codificante comprende una secuencia genética suicida seleccionada de entre los genes suicidas timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), citosina desaminasa (CD), timidina cinasa del virus de varicela zoster (VZV-tk), Estreptolisina O y toxina Diftérica, y dicho al menos un dominio de unión comprende una secuencia complementaria del pre-ARNm del miembro 1B3 de la familia del transportador aniónico orgánico vehículo de solutos (SLCO1B3).
2. El RTM de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia genética suicida codifica una proteína que cuando se expresa en una célula induce muerte celular o inhibe el crecimiento o división celular, preferentemente en el que dicha proteína media en la conversión de un profármaco inactivo en un fármaco activo que induce muerte celular o inhibe el crecimiento o división celular.
3. El RTM de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho al menos un dominio de unión comprende una secuencia complementaria de un intrón, exón o secuencia mixta intrón-exón del pre-ARNm de SLCO1B3, y preferentemente el intrón 3 de SLCO1B3.
4. El RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho dominio codificante comprende la secuencia de dicho gen suicida sin el codón de inicio de dicho gen suicida.
5. El RTM de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la HSV-TK, cuando se expresa en una células después de la reacción de trans-empalme, es capaz de iniciar la conversión del profármaco ganciclovir en trifosfato de ganciclovir.
6. El RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho pre-ARN asociado con un tumor es un pre-ARN asociado con un tumor seleccionado de entre tumores sólidos, especialmente cánceres del tracto gastrointestinal, el páncreas, mama, estómago, cuello uterino, vejiga, riñón, próstata, ovarios, endometrio, pulmón, cerebro, piel, tal como un melanoma, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células escamosas, cánceres de la cabeza y cuello, mesotelioma maligno de pleura, linfoma o mieloma múltiple, glioblastoma y tumores líquidos especialmente leucemias, tales como CML o ALL.
7. El RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la unión del RTM al pre-ARNm diana está mediado por complementariedad.
8. El RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es un ADN, ARN, híbrido ADN/ARN, o una molécula análoga de ácido nucleico.
9. Un vector de expresión recombinante, que comprende un RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. El vector de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho vector es un vector de expresión en eucariotas, preferentemente un vector que comprende secuencias derivadas de virus.
11. El vector de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que dicho vector comprende adicionalmente elementos reguladores específicos de células cutáneas y preferentemente de queratinocitos, fibroblastos o células endoteliales, para regular la expresión del transgén.
12. Una célula recombinante, preferentemente una célula cutánea recombinante tal como un queratinocito, fibroblasto o célula endotelial, que comprende una molécula de RTM de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un vector de expresión recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.
13. Una preparación farmacéutica, que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y el RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el vector de expresión recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, o la célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 12.
14. Un RTM de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el vector de expresión recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, la célula recombinante de acuerdo con la reivindicación 12, o la preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad.
15. El RTM, el vector de expresión recombinante, la célula recombinante, o la preparación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicha enfermedad es una enfermedad proliferativa, preferentemente enfermedades cancerosas, tales como cánceres de la piel, más preferentemente un carcinoma de células escamosas; o una enfermedad seleccionada de entre trastornos genéticos de la piel y de los epitelios, tal como la epidermólisis bullosa, fibrosis quística, paquioniquia congénita, enfermedades inmunológicas, tales como psoriasis o neurodermitis.

Figura 1:

A

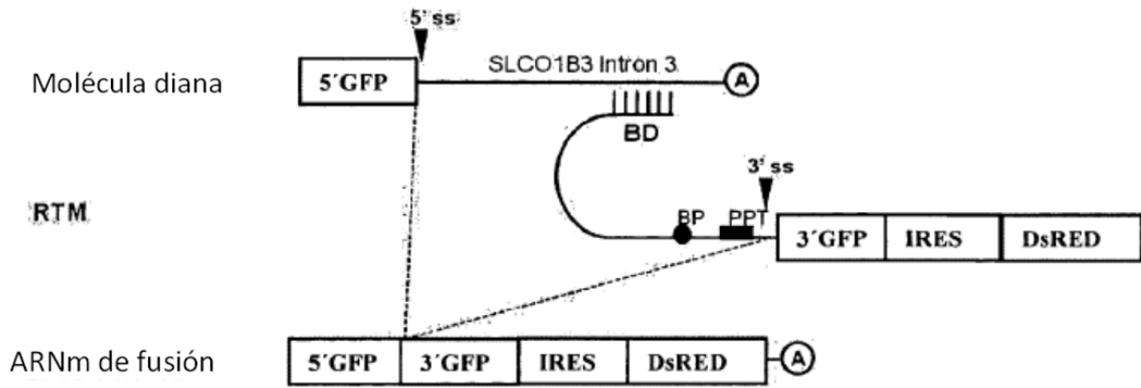


Figura 1 continuación:

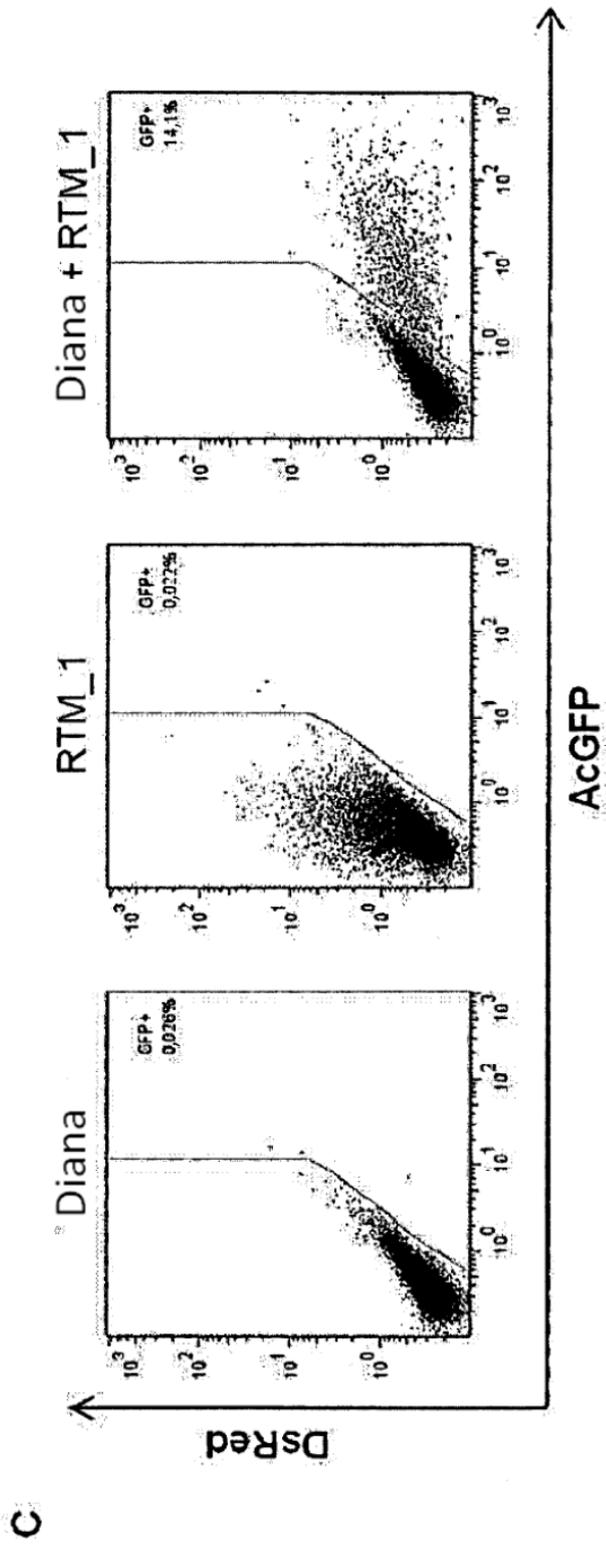
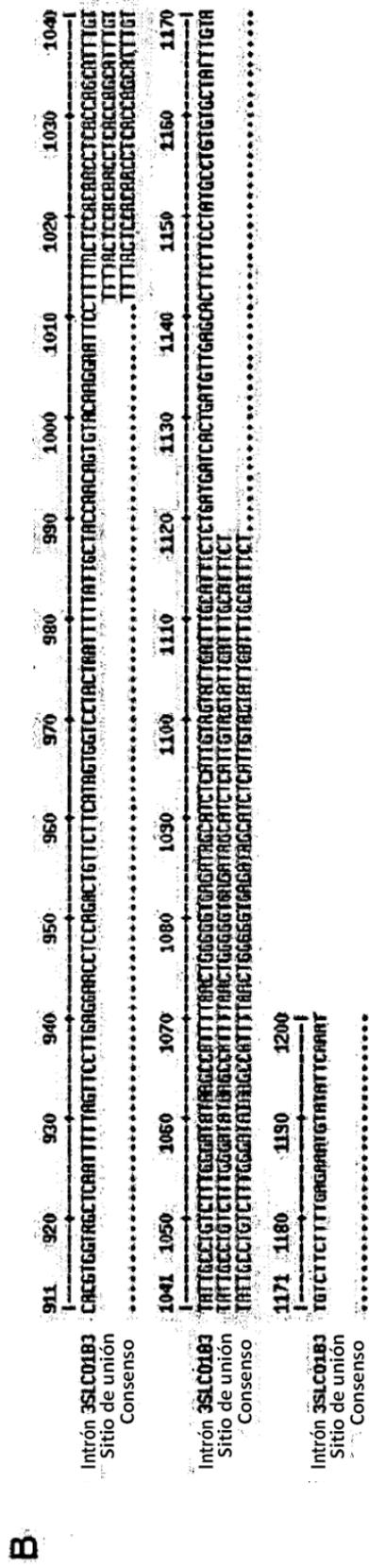


Figura 2:

A:

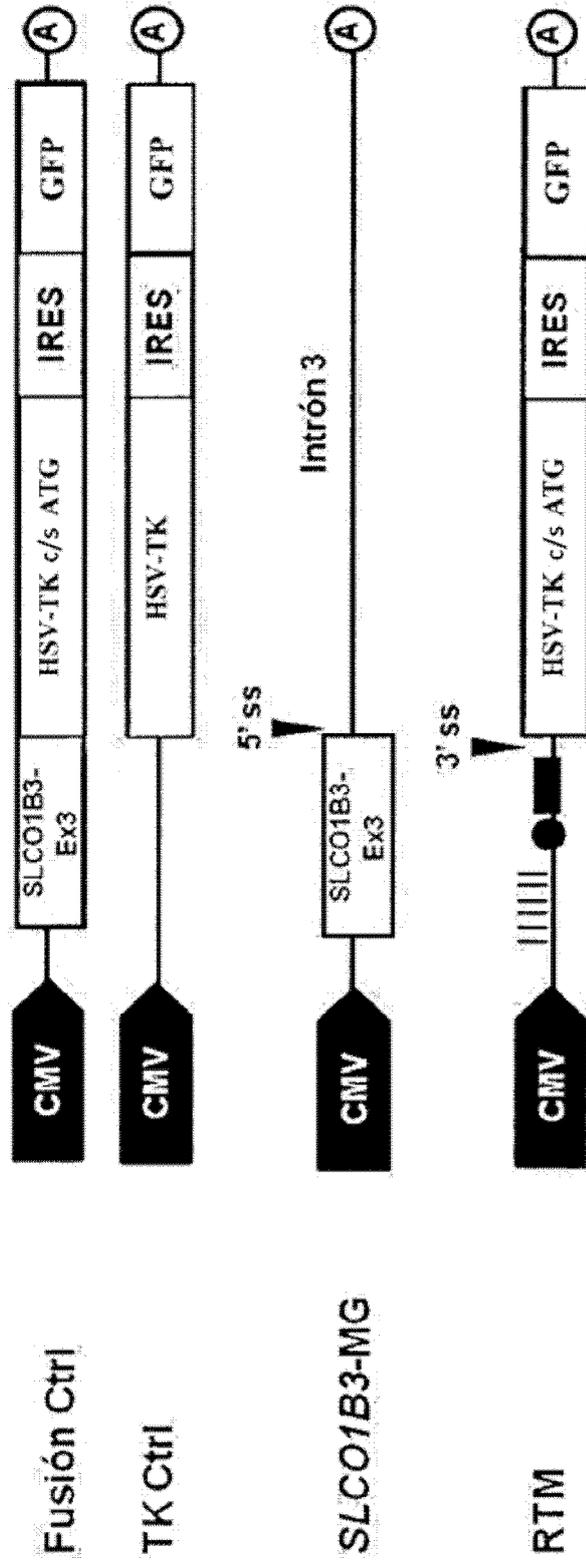


Figura 2 cont:

B:

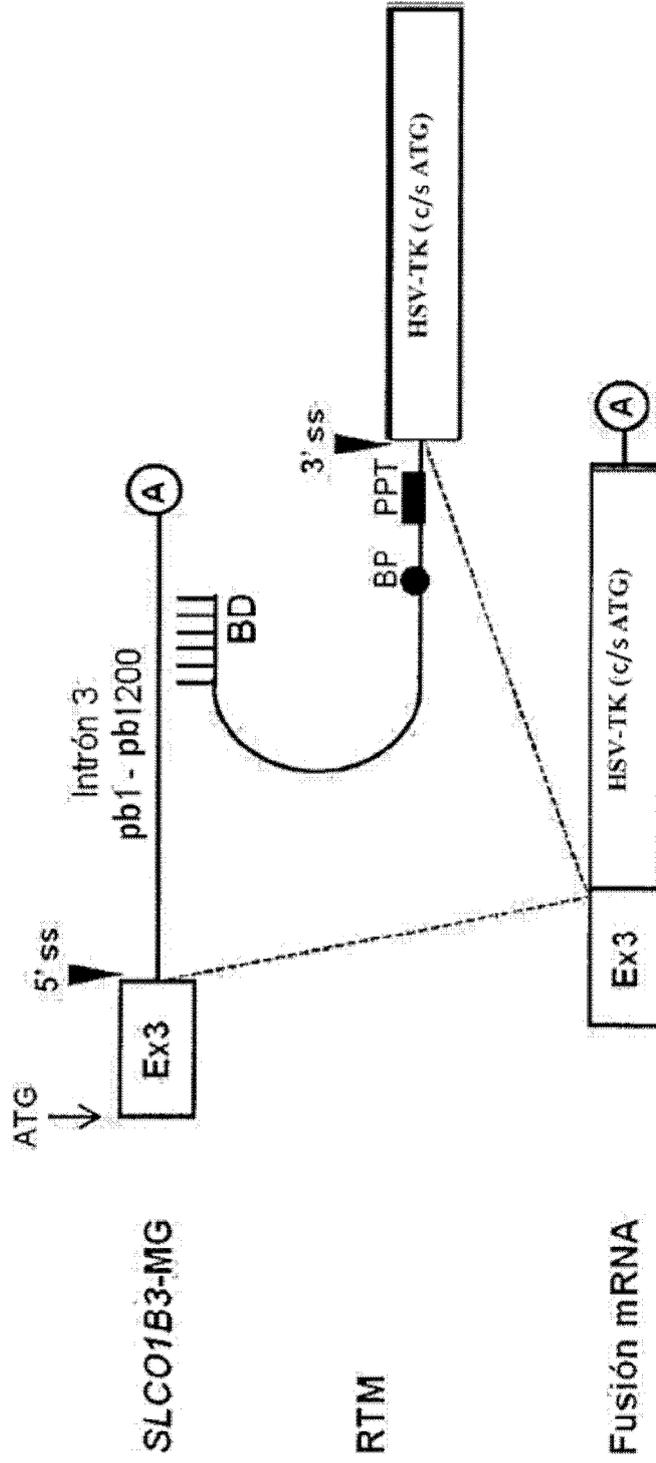


Figura 3:

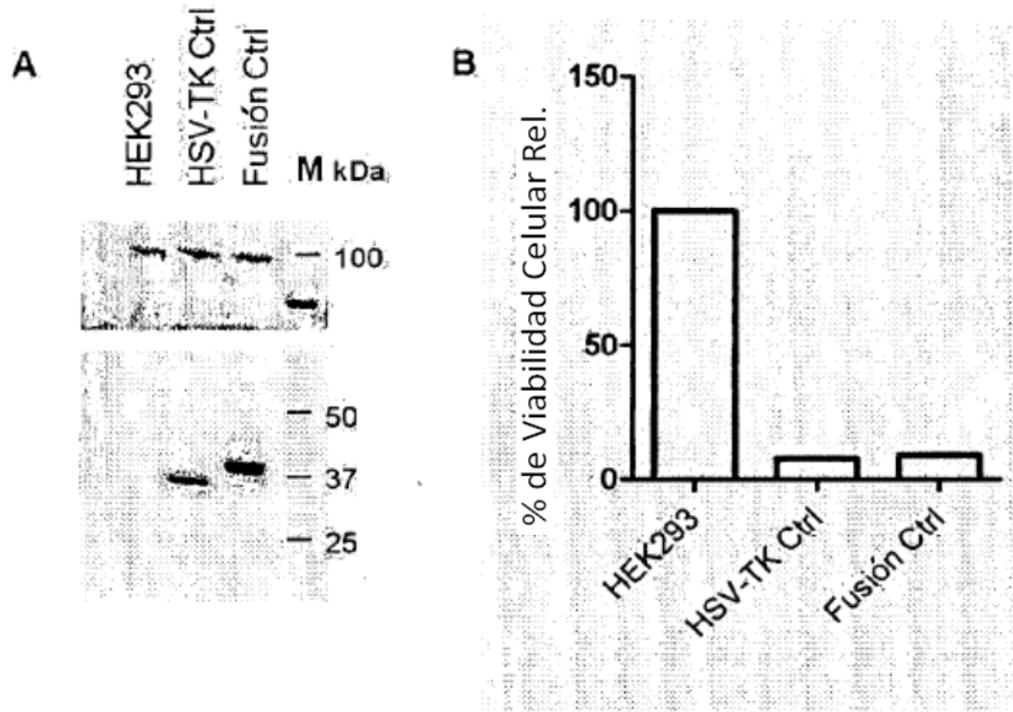
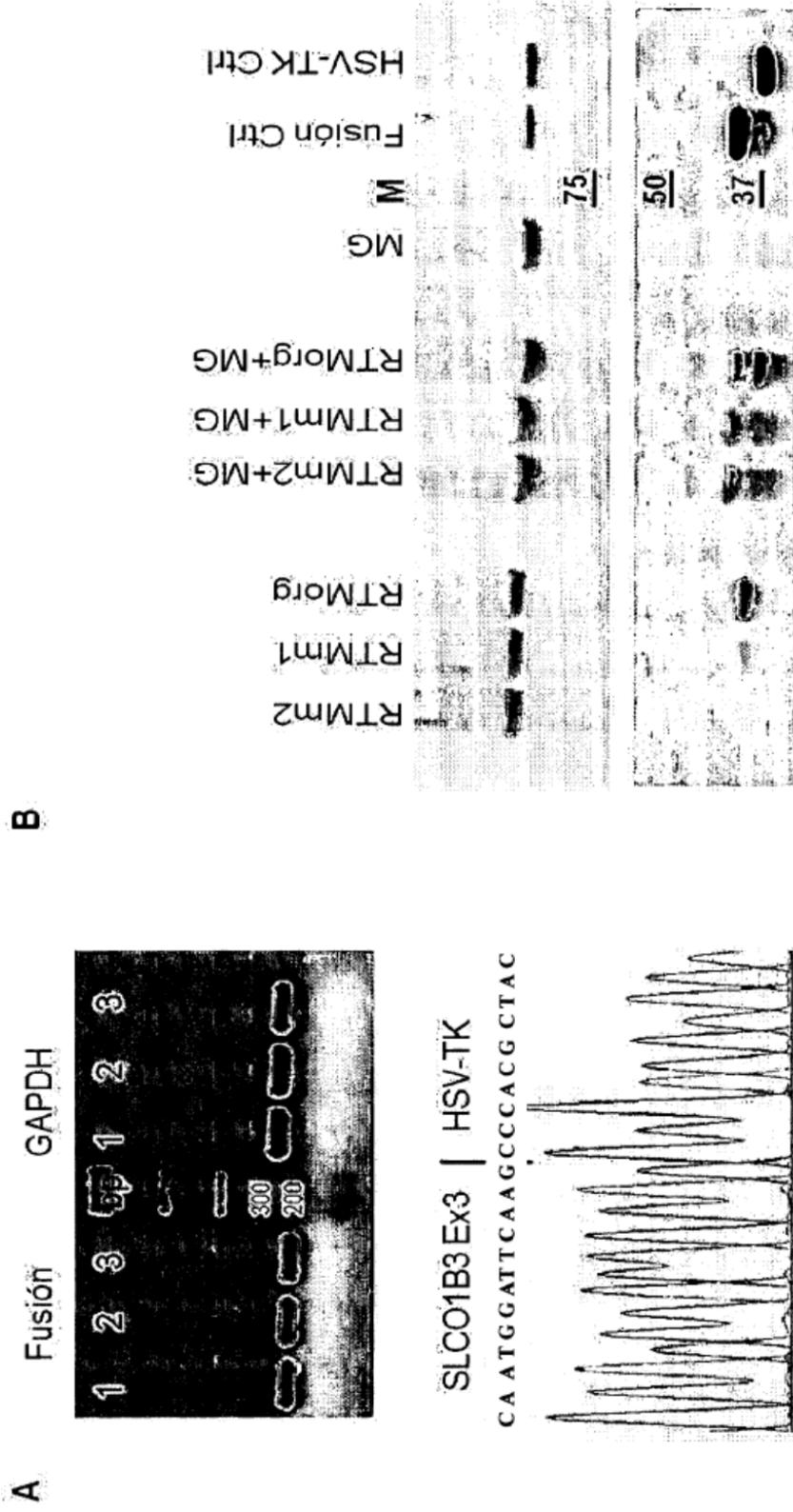


Figura 4:



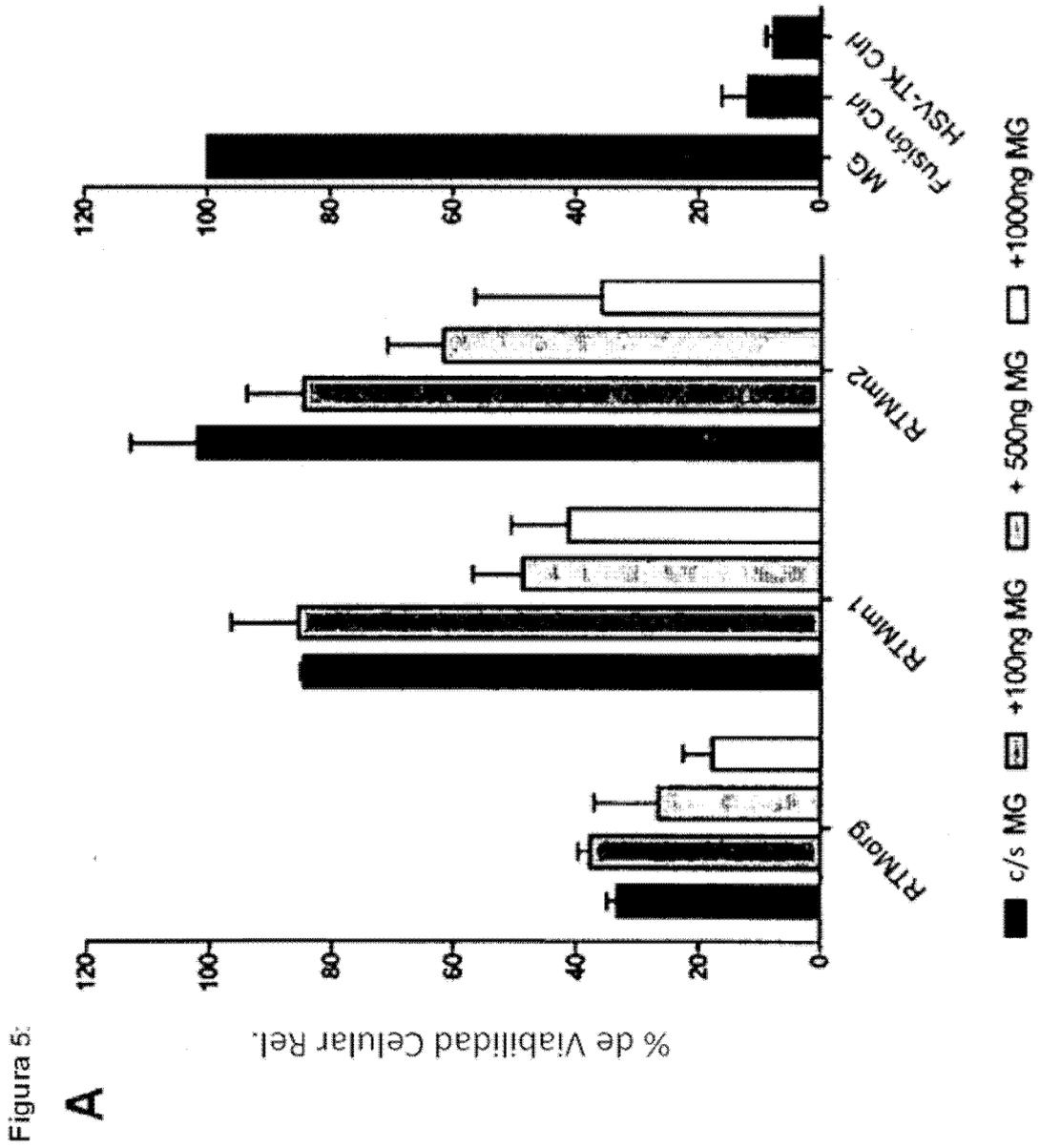


Figura 5 cont.:

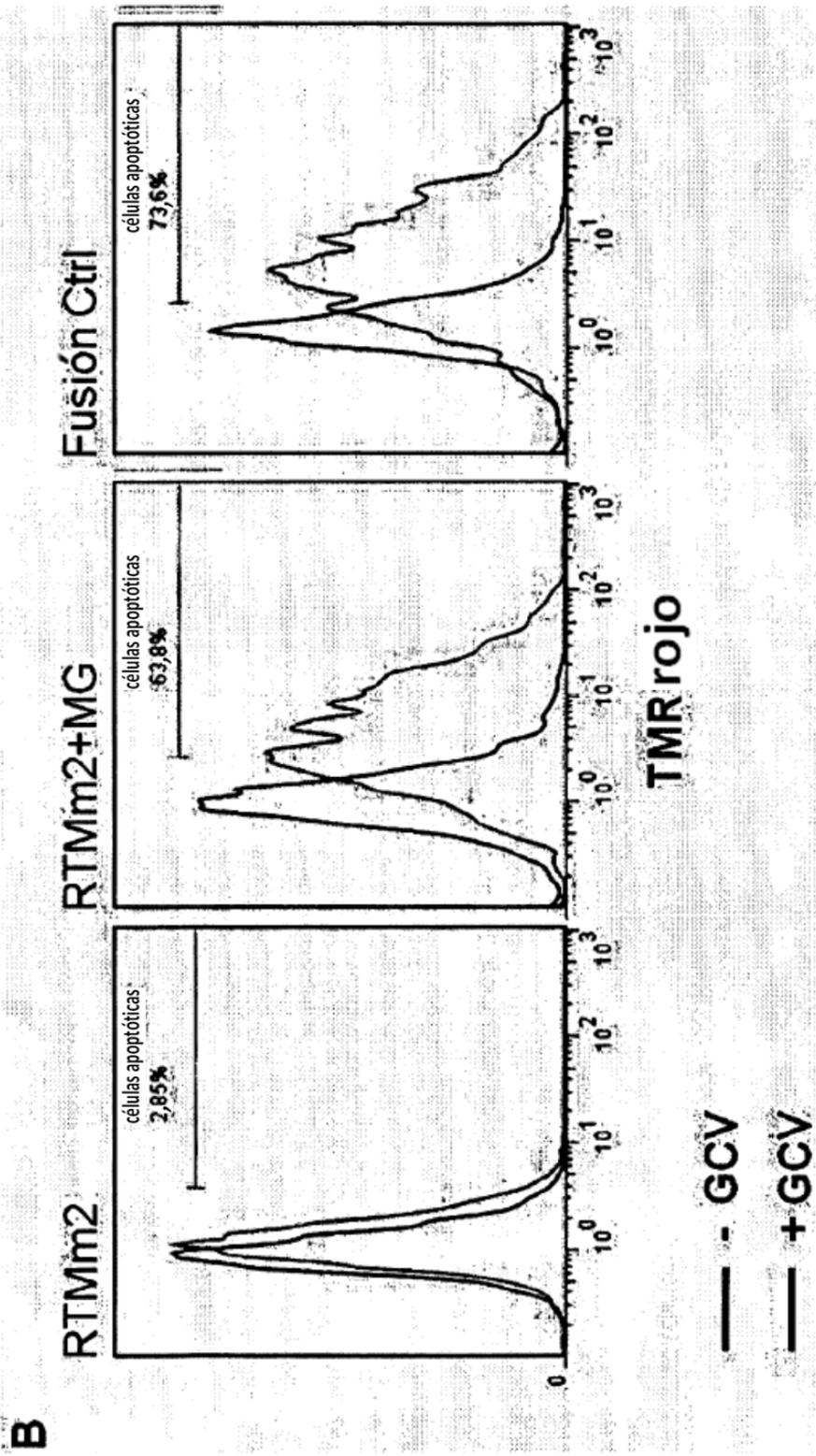


Figura 5 cont.:

**C**

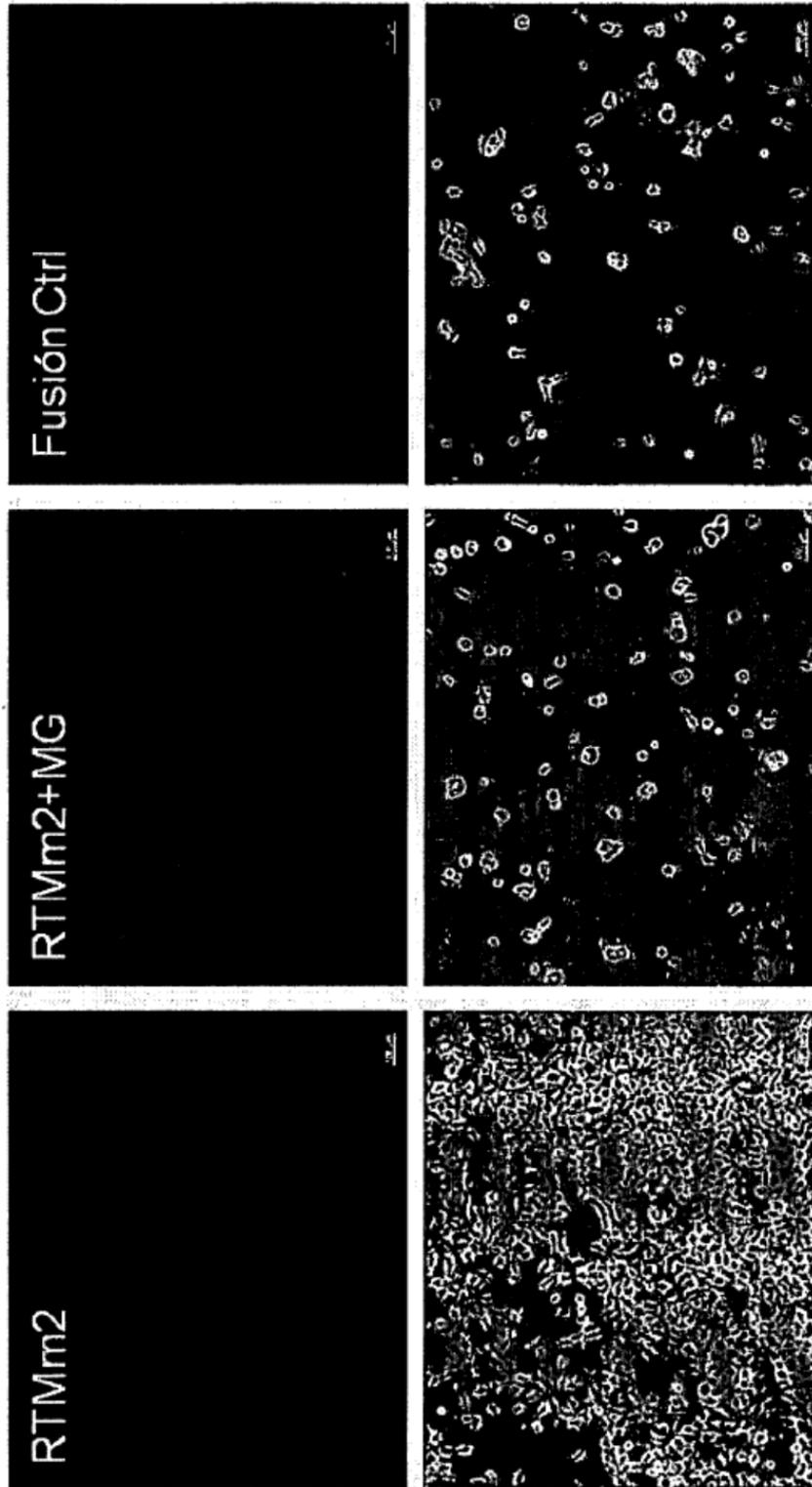


Figura 6:

