



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 320 157**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61K 31/7052 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05802308 .6**

(96) Fecha de presentación : **26.10.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1814907**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

(54) Título: **Kit de partes diseñado para poner en práctica un tratamiento antitumoral o antivírico en un mamífero.**

(30) Prioridad: **08.11.2004 EP 04360101**
26.01.2005 US 646595 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2009

(73) Titular/es: **TRANSGENE S.A.**
11, rue de Molsheim
67000 Strasbourg, FR

(72) Inventor/es: **Erbs, Philippe**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Kit de partes diseñado para poner en práctica un tratamiento antitumoral o antivírico en un mamífero.

5 La presente invención se refiere a un kit de partes que comprende un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen codificante de una permeasa y una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen suicida. Asimismo, la presente invención se refiere a un vector que comprende un gen codificante de una permeasa y un gen suicida. La presente invención resulta particularmente útil en el contexto de llevar a cabo un tratamiento de terapia génica de enfermedades proliferativas o infecciosas.

10 Los fármacos que comprende un grupo nucleobase son los fármacos más ampliamente utilizados para el tratamiento del cáncer o de la infección vírica. Entre ellos, se utilizan actualmente en la quimioterapia del cáncer los análogos de nucleósido, tales como citarabina, gemcitabina, fludarabina, cladribina, troxacitabina y clofarabina. Los análogos de nucleósido son antimetabolitos que interfieren con la síntesis de los ácidos nucleicos. Estos agentes son generalmente específicos de la fase S y pueden ejercer una actividad citotóxica mediante su incorporación y la alteración de las macromoléculas mismas de ADN y ARN, y/o mediante la interferencia con diversos enzimas implicados en la síntesis de los ácidos nucleicos, y/o mediante la modificación del metabolismo de los nucleósidos fisiológicos.

20 Los análogos de nucleósidos también han sido de los primeros compuestos que se ha demostrado que resultan efectivos contra las infecciones víricas. Por ejemplo, los primeros cuatro fármacos anti-VIH que se autorizaron: AZT, ddI, ddC y D4T, eran análogos de nucleósidos. La totalidad de estos fármacos y otros análogos de nucleósidos se cree que presentan un mecanismo similar de inhibición del VIH, en el que los nucleósidos resultan progresivamente fosforilados para formar un 5'-trifosfato, que después actúa como terminador de cadena en una reacción de transcriptasa inversa (RT).

30 También se utilizan análogos de nucleobase en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el fluorouracilo (5-FU) es una pirimidina fluorada que se metaboliza intracelularmente dando su forma activa, la fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP). La forma activa inhibe la síntesis del ADN mediante la inhibición de la producción normal de timidina. El fluorouracilo se administra intravenosamente para tratar los cánceres de colon, recto, mama, estómago y páncreas. El fluorouracilo también se encuentra disponible en cremas y soluciones para el tratamiento tópico de algunos cánceres de la piel y de verrugas genitales.

35 El desarrollo de la terapia génica ha abierto nuevas posibilidades para la utilización de fármacos que comprende un grupo nucleobase. Este dominio particular de la terapia génica que se denomina "terapia de genes suicidas" utiliza genes los productos de expresión de los cuales son capaces de transformar una sustancia inactiva (un profármaco) en una sustancia citotóxica, dando lugar de esta manera a la muerte celular.

40 El gen codificante de la timidina quinasa del virus herpes simplex de tipo 1 (HSV-1 TK) constituye el prototipo de los genes suicidas (Caruso *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7024-7028, 1993; Culver *et al.*, Science 256:1550-1552, 1992; Ram *et al.*, Nat. Med. 3:1354-1361, 1997). Aunque el polipéptido TK no es tóxico por sí mismo, cataliza la transformación de análogos de nucleósidos, tales como aciclovir o ganciclovir (GCV). Los nucleósidos modificados se incorporan en las cadenas de ADN que se encuentran en el proceso de alargamiento, inhibiendo la división celular en consecuencia. En la actualidad se encuentra disponible un gran número de parejas de gen suicida/profármaco. Aquellos que pueden mencionarse más específicamente son la purina nucleósido fosforilasa de *Escherichia coli* (*E. coli*) y la 6-metilpurina desoxiribonucleósido (Sorscher *et al.*, Gene Therapy 1:223-238, 1994), la guanina fosforibosil transferasa y la 6-tioxantina de *E. coli* (Mzoz y Moolten, Human Gene Therapy 4:589-595, 1993) y la citosina desaminasa (CDasa) y la 5-fluorocitosina (5-FC).

50 En el ser humano, el transporte de fármacos que comprende un grupo nucleobase a través de la membrana celular es pasivo o se realiza mediante un transportador membranal dedicado. Por ejemplo, la mayoría de los análogos de nucleósido son moléculas hidrofílicas y el transporte de las mismas a través de la membrana celular se encuentra regulado por el transportador membranal. En la células de mamífero, existen dos familias importantes de genes transportadores de nucleósido: los transportadores de nucleósidos equilibradores (ENTs) y los transportadores de nucleósidos concentradores (CNTs). Los ENTs son proteínas portadores facilitadas y los CNTs son transportadores activos secundarios dependientes de Na(+) (Kong *et al.*, Curr. Drug Metab. 5:63-84, 2004). Los transportadores de nucleósidos se encuentran implicados en la resistencia a los análogos de nucleósidos anticáncer. Un polimorfismo de un único nucleótido (SNPs) en los transportadores de fármacos puede contribuir a la variación interindividual en respuesta a los análogos de nucleósidos (Damaraju *et al.*, Oncogene 22:7524-36, 2003). Por lo tanto, existe una necesidad de una nueva estrategia terapéutica que pueda evitar la expresión reducida o no existente de los transportadores de nucleósidos. Además, también existe una necesidad de incrementar la concentración intracelular de fármacos que comprende un grupo nucleobase debido a que la concentración intracelular se correlaciona con la eficiencia terapéutica.

65 Koike *et al.* (Cancer Res. 57(24):5475-9, 15 de diciembre de 1997) da a conocer un vector que contiene una secuencia antisentido parcial de ADNc de MOATc (un transportador membranal). Dicho vector no codifica la proteína MOATc aunque es capaz de inhibir la expresión de proteína MOATc en las células transfectadas. Las células transfec-

tadas con este vector se sometieron a ensayo para su sensibilidad a diversos fármacos, comprendiendo algunos de ellos nucleobases. D1 no describe la combinación de un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase y de una secuencia que comprende un gen codificante de una permeasa. Además, D1 en ningún caso describe ni sugiere la utilización adicional de un gen suicida.

Patel *et al.* (Blood 95(7):2356-63, 1 de abril de 2000) describen un vector retrovítico codificante del transportador de nucleósidos hENT2, y la utilización del mismo para transfectar células. A continuación, estas células se sometieron a ensayo para su sensibilidad a diversos fármacos que comprendían nucleobases. D2 en ningún caso describe ni sugiere la utilización adicional de un gen suicida.

Anand *et al.* (Expert Opin. Biol. Ther. 2(6):607-20, agosto de 2002) es un artículo de revisión que se centra en profármacos que reconocen transportadores/receptores membranales. El párrafo 3.3 se refiere particularmente a un sistema de transporte de nucleósidos y nucleobases y describe varios transportadores membranales de nucleósidos, así como nuevos compuestos que reconocen dichos transportadores. D3 no describe ni sugiere la utilización combinada de un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase y de una secuencia que comprende un gen codificante de una permeasa. Además, D3 en ningún caso describe ni sugiere la utilización adicional de un gen suicida.

Uno de los objetivos de la presente invención es incrementar la concentración intracelular de fármacos que comprenden un grupo nucleobase en las células (por ejemplo células tumorales o células infectadas víricamente). Este objetivo se consigue mediante la transfección de las células diana con una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen codificante de una permeasa.

La presente invención también presenta como objetivo la eficacia de la terapia de genes suicidas, mediante la utilización en combinación de una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen codificante de una permeasa, y una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen suicida. Esta utilización particular incrementa la concentración intracelular del profármaco (es decir, el precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase) que puede ser convertido por la proteína codificada por el gen suicida. Esta utilización también puede incrementar el efecto espectador mediante el incremento de la transferencia del fármaco desde las células transfectadas por el gen suicida a las células que expresan la permeasa.

A este respecto, la presente invención también permite utilizar una cantidad más reducida de fármacos o profármacos y reducir los efectos secundarios inducidos por dichos tratamientos.

Para dicho fin, la presente invención proporciona un kit de partes que comprende:

- un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase, y
- una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen codificante de una permeasa, y
- una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen suicida.

En una forma de realización preferida, el kit de partes según la invención está destinado a la utilización para el tratamiento del cáncer y/o de enfermedades víricas en vertebrados y más particularmente en seres humanos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un fármaco que comprende un grupo nucleobase es una molécula que comprende en su estructura únicamente un grupo nucleobase. Según una forma de realización preferida de la invención, el fármaco que comprende un grupo nucleobase es capaz de eliminar células y más preferentemente es capaz de eliminar las células tumorales. Según otra forma de realización preferida, el fármaco que comprende un grupo nucleobase es capaz de reducir o evitar la replicación de un virus en una célula.

Según la invención, se selecciona un grupo nucleobase de entre el grupo constituido por Adenina, Timina, Guanina, Uracilo, Citosina y análogos de los mismos.

Según una forma de realización preferida de la invención, se selecciona un fármaco que comprende un grupo nucleobase de entre el grupo que comprende:

- análogos de nucleósidos, tales como citarabina, gemcitabina, capecitabina, fludarcibina, cladribina, troxycitabina, clofarabina, azidotimidina (AZT), didanosina (ddl), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T), fluorometilén desoxicitidina (FMdC) y lamivudina, floxuridina (FUdR) y
- análogos de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo (5-FU), y
- análogos de purina, tales como tioguanina, mercaptopurina, aciclovir, valaciclovir, famciclovir, ganciclovir.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase se refiere a una molécula que puede ser convertida en una o más reacciones enzimáticas en un fármaco que comprende un grupo nucleobase.

5 Según una forma de realización preferida de la invención, un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase se selecciona de entre el grupo que comprende azidotimidina (AZT), ganciclovir (GCV), 5-fluorocitosina (5-FC), 5-fluorouracilo (5-FU), 6-metilpurina desoxiribonucleósido, ganciclovir éster de ácido eláidico, penciclovir, aciclovir, valaciclovir, (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina, zidovudina, 2'-exo-metanocarbatimidina.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, la permeasa se refiere a una proteína transmembranal implicada en la transferencia de un fármaco que comprende un grupo nucleobase, o un precursor del mismo a través de la membrana celular.

15 La permeasa según la invención notablemente se refiere a una purina permeasa, una citosina permeasa y transportadores de nucleósidos.

Según una forma de realización preferida de la invención, la permeasa es una purina permeasa o una citosina permeasa de *S. cerevisiae*. Los transportadores de nucleobase de *S. cerevisiae* consisten de la purina-citosina permeasa, conocida como FCY2, y la uracilo permeasa, conocida como FUR4. Según una forma de realización más preferente de la invención, la permeasa presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende la SEC ID nº 1 y la SEC ID nº 2.

25 La purina-citosina permeasa, FCY2, media en el simporte de protones y adenina, guanina, hipoxantina y citosina a través de la membrana plasmática de levaduras (Grenson, 1969; Jund y Lacroute, 1970; Polak y Grenson, 1973; Chevallier *et al.*, 1975; Hopkins *et al.*, 1988). La proteína FCY2 media también en el transporte de la 5-fluorocitosina, un análogo de la citosina (Grenson, 1969; Jund y Lacroute, 1970). El gen *FCY2* codifica una proteína de 533 aminoácidos (58 kDa) que inicialmente se predijo que presentaba 10 a 12 dominios transmembranales (Weber *et al.*, 1990), favoreciéndose en la actualidad nueve de ellos (Ferreira *et al.*, 1999). FCY2 muestra afinidades similares para las nucleobases purina y la citosina (Brethes *et al.*, 1992). La incorporación de uracilo en *S. cerevisiae* está mediada por la uracilo permeasa, FUR4 (Jund y Lacroute, 1970; Jund *et al.*, 1977). FUR4 es un simportador de protones del uracilo (Hopkins *et al.*, 1988) que se predice que es una proteína de 633 aminoácidos (71,7 kDa) con 10 dominios transmembranales y colas N-terminales y C-terminales hidrofílicas citoplasmáticas largas (Jund *et al.*, 1988; Gamier *et al.*, 1996). La proteína FUR4 también puede mediar en el transporte del 5-fluorouracilo, un análogo del uracilo (Jund y Lacroute, 1970).

35 A este respecto, según una forma de realización preferida, la permeasa se selecciona de entre el grupo que comprende FCY2 y Fur4 y análogos de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de FCY2 y Fur4 notablemente se encuentran disponibles en la base de datos Swissprot (números de acceso P17064 y P05316, respectivamente). Los análogos de Fur4 y FCY2 se refieren a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos un grado de identidad superior a 70%, ventajosamente superior a 80%, preferentemente superior a 90%, y todavía más preferentemente superior a 95% con la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que conserva la capacidad de transportar un fármaco que comprende un grupo nucleobase a través de la membrana celular.

45 Según otra forma de realización preferida, la permeasa se selecciona de entre el grupo que comprende hENT1, hENT2, hCNT1, hCNT2 y hCNT3, y análogos de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de estas permeasas se encuentran disponibles para el experto en la materia, notablemente en la base de datos Swissprot. Los análogos de estos polipéptidos se refieren a un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos un grado de identidad superior a 70%, ventajosamente superior a 80%, preferentemente superior a 90%, y más preferentemente superior a 95% con la secuencia de aminoácidos del polipéptido parental y que conserva la capacidad de transportar un fármaco que comprende un grupo nucleobase a través de la membrana celular.

50 El experto en la materia es capaz de seleccionar la permeasa que se asociará con el fármaco o con el precursor del fármaco, que comprende un grupo nucleobase. Por ejemplo, FCY2 y Fur4 preferentemente se asocian a 5-FC.

55 La expresión gen suicida se refiere a un gen codificante de una proteína capaz de convertir un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase en un fármaco que comprende un grupo nucleobase.

Los genes suicidas comprenden, aunque sin limitación, los genes codificantes de proteínas que presentan una actividad de citosina desaminasa, una actividad de timidina quinasa, una actividad de uracilo fosforibosiltransferasa, una actividad de purina nucleósido fosforilasa y/o una actividad de timidilato quinasa.

60 Preferentemente, el gen suicida comprendido en el kit de partes según la invención codifica una proteína capaz de transformar el precursor del fármaco que comprende un grupo nucleobase, comprendida en el mismo kit de partes. Los ejemplos de genes suicidas y precursores correspondientes de un fármaco que comprende un grupo nucleobase se dan a conocer en la tabla siguiente:

Gen suicida	precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase
Timidina quinasa	Ganciclovir, Ganciclovir éster de ácido elaídico, penciclovir, aciclovir valaciclovir, (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina, zidovudina, 2'-exo-metanocarbamidina
Citosina desaminasa	5-fluorocitosina
Purina nucleósido fosforilasa	6-metilpurina desoxiribósido, fludarabina
Uracilo fosforibosiltransferasa	5-fluorocitosina 5-fluorouracilo
Timidilato quinasa	azidotimidina

Según una forma de realización preferida de la invención, el gen suicida según la invención codifica una proteína que presenta por lo menos una actividad de CDasa. La CDasa se encuentra implicada en la ruta metabólica de pirimidinas en la que la citosina exógena se transforma en uracilo por medio de una desaminación hidrolítica. Aunque se han demostrado actividades de CDasa en procariotas y en eucariotas inferiores (Jund y Lacroute, J. Bacteriol. 102:607-615, 1970; Beck *et al.*, J. Bacteriol. 110:219-228, 1972; De Haan *et al.*, Antonie van Leeuwenhoek 38:257-263, 1972; Hoeprich *et al.*, J. Inf. Dis. 130:112-118, 1974; Esders y Lynn, J. Biol. Chem. 260:3915-3922, 1985), no se encuentran presentes en mamíferos (Koechlin *et al.*, Biochem. Pharmacol. 15:435-446, 1966; Polak *et al.*, Chemotherapy 22:137-153, 1976). Son conocidos los genes FCY1 de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y codA de *E. coli*, que codifican respectivamente la CDasa de estos dos organismos, y las secuencias de dichos genes han sido publicadas (patente EP nº 402 108; Erbs *et al.*, Curr. Genet. 31:1-6, 1997; patente WO nº 93/01281).

La CDasa desamina asimismo un análogo de la citosina, la 5-fluorocitosina (5-FC), formando de esta manera 5-fluorouracilo (5-FU), que es un compuesto que es altamente citotóxico al convertirse en 5-fluoro-UMP (5-FUMP). Las células que carecen de actividad de CDasa, debido a una mutación que inactiva el gen codificante del enzima o debido a que son naturalmente deficientes en este enzima, como ocurre en las células de mamífero, son resistentes a 5-FC (Jund y Lacroute, J. Bacteriol. 102:607-615, 1970; Kilstrup *et al.*, J. Bacteriol. 171:2124-2127, 1989). En contraste, las células de mamífero en las que se transfirieron las secuencias codificantes de actividad de CDasa se sensibilizaron frente a 5-FC (Huber *et al.*, Cancer Res. 53:4619-4626, 1993; Mullen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:33-37, 1992; patente WO nº 93/01281). Además, las células contiguas no transformadas también se sensibilizaron frente a 5-FC (Huber *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8302-8306, 1994). Este fenómeno, que se denomina efecto espectador, se debe a las células que expresan la actividad de CDasa segregando 5-FU, que después intoxican las células contiguas mediante difusión simple a través de la membrana plasmática. Esta propiedad de 5-FU de difusión pasiva representa una ventaja en comparación con el sistema de referencia tk/GCV, en el que el efecto espectador requiere que exista contacto con las células que expresan tk (Mesnil *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1831-1835, 1996). Todas las ventajas que ofrece la CDasa dentro del contexto de la terapia génica, en particular la terapia génica anticáncer, por lo tanto pueden entenderse fácilmente.

A este respecto, según una forma de realización más preferida de la invención, el gen codificante de una proteína que presenta una actividad de CDasa es FCY1 o CodA o un análogo de los mismos. Los análogos de estos genes se refieren a un gen que presenta una secuencia de ácidos nucleicos que presenta por lo menos un grado de identidad superior a 70%, ventajosamente superior a 80%, preferentemente superior a 90%, y todavía más preferentemente superior a 95% con la secuencia de ácidos nucleicos del gen parental. La solicitud de patente FR nº 2004/001657 da a conocer un gen codificante de una proteína que presenta una actividad de CDasa mejorada. Este polipéptido deriva de una CDasa nativa mediante la adición de una secuencia de aminoácidos. Según otra forma de realización preferida de la invención, la proteína que presenta una actividad de CDasa es un polipéptido dado a conocer en el documento FR nº 2004/001657 y más preferentemente el polipéptido representado en el identificador de secuencia SEC ID nº 1 del documento FR nº 2004/001657.

En procariotas y en eucariotas inferiores, el uracilo se transforma en UMP mediante la acción de la uracilo fosforibosiltransferasa (UPRTasa). Este enzima convierte 5-FU en 5-FUMP. Según otra forma de realización preferida, el gen suicida según la invención codifica una proteína que presenta una actividad UPRTasa.

La UPRTasa en cuestión en la presente invención puede ser de cualquier origen, en particular de origen procariótico, fúngico o de levadura. A título ilustrativo, las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las UPRTasas de *E. coli* (Anderson *et al.*, Eur. J. Biochem. 204:51-56, 1992), de *Lactococcus lactis* (Martinussen y Hammer, J. Bacteriol.

176:6457-6463, 1994), de *Mycobacterium bovis* (Kim *et al.*, Biochem. Mol. Biol. Int. 41:1117-1124, 1997) y de *Bacillus subtilis* (Martinussen *et al.*, J. Bacteriol. 177:271-274, 1995) pueden utilizarse en el contexto de la invención. Sin embargo, resulta especialmente preferente la utilización de una UPRTasa de levadura y en particular la codificada por el gen *FUR1* de *S. cerevisiae*, la secuencia del cual dada a conocer en Kern *et al.* (Gene 88:149-157, 1990) se proporciona en la presente memoria como referencia. A modo de guía, las secuencias de los genes y aquellos de las UPRTasas correspondientes pueden encontrarse en la literatura y en los bancos de datos especializados (SWISSPROT, EMBL, GenBank, Medline y similares).

Además, la solicitud de patente PCT FR n° 99/00904 describe un gen 30 *FUR1* que carece de 105 nucleótidos en dirección 5' de la parte codificante que permiten la síntesis de una UPRTasa de la que se han delecionado los 35 primeros residuos en la posición N-terminal y partiendo de la metionina en la posición 36 en la proteína nativa. El producto de expresión del gen mutante, denominado *FUR1Δ105*, es capaz de complementar un mutante *fur1* de *S. cerevisiae*. Además, el mutante truncado muestra una actividad UPRTasa más alta que la del enzima nativo. De esta manera, según una forma de realización particularmente ventajosa, el polipéptido codificado por el gen suicida según la invención es un mutante por delección de una UPRTasa nativa. La delección preferentemente se encuentra localizada en la región N-terminal de la UPRTasa original. Puede ser completa (que afecta a todos los residuos de dicha región N-terminal) o parcial (que afecta a uno o más residuos continuos o discontinuos en la estructura primaria). En general, un polipéptido consiste de partes N-terminal, central y C-terminal, representando cada una aproximadamente un tercio de la molécula. Por ejemplo, debido a que la UPRTasa de *S. cerevisiae* presenta 251 aminoácidos, la parte N-terminal de la misma consiste de los primeros 83 residuos partiendo del denominado iniciador metionina situado en la primera posición de la forma nativa. Respecto a la UPRTasa de *E. coli*, la parte N-terminal de la misma cubre las posiciones 1 a 69.

Una proteína preferida que presenta una actividad UPRTasa comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente tal como se representa en el identificador de secuencia SEC ID n° 1 del documento PCT FR n° 99/00904, partiendo del residuo Met en la posición 1 y que finaliza con el residuo Val en la posición 216. El término "sustancialmente" se refiere a un grado de identidad con dicha secuencia SEC ID n° 1 del documento PCT FR n° 99/00904 superior a 70%, ventajosamente superior a 80%, preferentemente superior a 90%, y todavía más preferentemente superior a 95%. Todavía más preferentemente, comprende la secuencia de aminoácidos representada en el identificador de secuencia SEC ID n° 1 del documento PCT FR n° 99/00904. Tal como se ha indicado anteriormente, puede comprender mutaciones adicionales. Puede indicarse en particular la sustitución del residuo serina en la posición 2 (posición 37 en la UPRTasa nativa) por un residuo de alanina.

Según otra forma de realización preferida, el gen suicida de la invención codifica una proteína que presenta por lo menos una actividad de CDasa y una de UPRTasa. Las solicitudes de patente WO n° 96/16183 y de patente PCT FR n° 99/00904 describen la utilización de una proteína de fusión codificante de un enzima con dos dominios que presentan las actividades de CDasa y de UPRTasa y demuestran que la transferencia de un gen híbrido *codA::upp* o *FCY1::FUR1* o *FCY1::FUR1Δ105* transportados por un plásmido de expresión incrementa la sensibilidad de las células B16 transfectadas frente a 5-FC. Las secuencias de proteína y de ácidos nucleicos se describe en dichas dos solicitudes.

Aunque la fusión puede tener lugar en cualquier sitio del primer polipéptido, los extremos N-terminal y C-terminal resultan preferentes y en particular el extremo N-terminal. Ventajosamente, la fusión en fase utiliza un segundo polipéptido que presenta una actividad de citosina desaminasa (CDasa) y que se deriva de una citosina desaminasa nativa, de manera que el polipéptido de fusión según la invención muestra las actividades de CDasa y de UPRTasa. Resulta preferente una fusión *FCY1::FUR1*. Este tipo de polipéptido bifuncional hace posible mejorar la sensibilidad de las células diana frente a 5-FC y a 5-FU.

Se utiliza una CDasa de origen procariótico o eucariótico inferior. Todavía más preferentemente, es una CDasa de levadura, y en particular la codificada por el gen *FCY1* de *Saccharomyces cerevisiae*. La clonación y la secuenciación de los genes codificantes de las Casas procedentes de diversos orígenes se encuentran disponibles en la literatura y en bancos de datos especializados. Debe indicarse que la secuencia del gen *FCY1* se da a conocer en Erbs *et al.* (Curr. Genet. 31:1-6, 1997). Evidentemente resulta posible utilizar un mutante de CDasa que presente una capacidad de conversión comparable o superior a la del enzima nativo.

Los expertos en la materia son capaces de clonar las secuencias de CDasa o de UPRTasa a partir de los datos publicadas y de llevar a cabo mutaciones posibles, de someter a ensayo la actividad enzimática de las formas mutantes en un sistema acelular o celular según la tecnología de la técnica anterior o basándose en el protocolo indicado en la solicitud PCT FR n° 99/00904 y de fusionar, en particular en fase, los polipéptidos con actividad de CDasa y de UPRTasa, y en consecuencia la totalidad o parte de los genes correspondientes.

Según una forma de realización más preferida de la invención, el gen suicida codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente tal como se representa en el identificador de secuencia SEC ID n° 2 del documento PCT FR n° 99/00904, partiendo del residuo Met en la posición 1 y que finaliza en el residuo Val en la posición 373. El término "sustancialmente" presenta la definición proporcionada anteriormente. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se representa en el identificador de secuencia SEC ID n° 2 del documento PCT FR n° 99/00904 resulta más particularmente adecuado para llevar a cabo la invención.

Otro polipéptido codificado preferente se da a conocer en la patente WO n° 96/16183 y más preferentemente el polipéptido codificado por coda::upp o FCY1::FUR1.

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden obtenerse fácilmente mediante clonación, mediante PCR o mediante síntesis química de acuerdo con las técnicas convencionales al uso. Pueden ser genes nativos o genes derivados de estos últimos mediante mutación, delección, sustitución y/o adición de uno o más nucleótidos. Además, las secuencias de los mismos se encuentran ampliamente descritas en la literatura, que puede ser consultada por los expertos en la materia.

Asimismo, la presente invención se refiere a un kit de partes tal como se ha presentado anteriormente, caracterizado porque dichas secuencias de ácidos nucleicos se insertan en uno o más vectores recombinantes de origen plasmídico o vírico, y en los vectores recombinantes que portan dichas secuencias de nucleótidos situadas bajo el control de los elementos necesarios para su expresión en una célula huésped.

Más particularmente, el kit de partes de la invención puede comprender dicha secuencia de ácidos nucleicos, comprendiendo un gen codificante de una permeasa y comprendiendo dicha secuencia de ácidos nucleicos un gen suicida insertado en el mismo vector recombinante o en vectores recombinantes diferentes. Según una forma de realización preferida, las secuencias de ácidos nucleicos se encuentran comprendidas en el mismo vector recombinante.

Asimismo, se ha descrito un vector recombinante que porta por lo menos una de las secuencias de nucleótidos según la invención situada bajo el control de los elementos que resultan necesarios para expresarlas en una célula huésped. Más particularmente, se ha descrito un vector recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificantes de una permeasa.

El vector recombinante puede ser de origen plasmídico o vírico y puede, en caso apropiado, combinarse con una o más sustancias que mejoren la eficiencia de transfección y/o la estabilidad del vector. Estas sustancias se encuentran ampliamente documentadas en la literatura, que se encuentra disponible para el experto en la materia (ver, por ejemplo, Feigner *et al.*, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32:115-121, 1987; Hodgson y Solaiman, Nature Biotechnology 14:339-342, 1996; Remy *et al.*, Bioconjugate Chemistry 5:647-654, 1994). A título de ilustración no limitativa, las sustancias pueden ser polímeros, lípidos, en particular lípidos catiónicos, liposomas, proteínas nucleares o lípidos neutros. Estas sustancias pueden utilizarse solas o en combinación. Una combinación que puede contemplarse es una de un vector plasmídico recombinante que se combina con lípidos catiónicos (DOGS, DC-CHOL, espermina-chol, spermidina-chol, etc.), lisofosfolípidos (por ejemplo hexadecilfosfocolina) y lípidos neutros (DOPE).

Según una forma de realización preferida, los lípidos catiónicos que pueden utilizarse en la presente invención son los lípidos catiónicos descritos en la patente EP n° 901463B1, y más preferentemente pcTG90.

La elección de los plásmidos que pueden utilizarse dentro del contexto de la presente invención es inmensa. Pueden ser vectores de clonación y/o vectores de expresión. De una manera general son conocidos del experto en la materia y, aunque algunos de ellos se encuentran disponibles comercialmente, también resulta posible construirlos o modificarlos utilizando las técnicas de la manipulación genética. Son ejemplos que pueden mencionarse los plásmidos que se derivan de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) o pPoly (Lathe *et al.*, Gene 57:193-201, 1987). Preferentemente, un plásmido que se utiliza en el contexto de la presente invención contiene un origen de replicación que garantiza que la replicación se inicia en una célula productora y/o en una célula huésped (por ejemplo el origen ColE1 se selecciona para un plásmido destinado a ser producido en *E. coli*, y se selecciona el sistema oriP/EBNA1 si se desea que el plásmido sea autoreplicante en una célula huésped de mamífero; Lupton y Levine, Mol. Cell. Biol. 5:2533-2542, 1985; Yates *et al.*, Nature 313:812-815). El plásmido adicionalmente puede comprender un gen de selección que permite seleccionar o identificar las células transfectadas (complementación de una mutación auxotrófica, gen codificante de una resistencia a un antibiótico, etc.). Naturalmente el plásmido puede contener elementos adicionales que mejoran su mantenimiento y/o su estabilidad en una célula dada (secuencia *cer*, que estimula el mantenimiento de un plásmido en forma monomérica (Summers y Sherrat, Cell 36:1097-1103, 1984; secuencias para la integración en el genoma celular).

Con respecto a un vector vírico, resulta posible contemplar un vector que se derive de un virus de la viruela (virus Vaccinia, en particular MVA, virus de la viruela del canario, etc.), de un adenovirus, de un retrovirus, de un virus herpes, de un alfavirus, de un virus espumoso o de un virus adenoasociado. Resulta posible utilizar vectores víricos competentes para la replicación o deficientes en replicación. Resulta preferente la utilización de un vector que no se integre. A este respecto los vectores adenovíricos y MVA resultan muy particularmente adecuados para implementar la presente invención.

Según una forma de realización preferida, el vector vírico según la invención se deriva de un virus Vaccinia Ankara modificado (MVA). Los vectores MVA y los procedimientos para producir dichos vectores se encuentran descritos en detalle en las patentes europeas EP n° 83286 y n° 206920, así como en Mayr *et al.*, (Infection 3:6-14, 1975) y en Sutter y Moss (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10847-10851, 1992). Según una forma de realización más preferida, la secuencia de nucleótidos según la invención puede insertarse en la delección I, II, III, IV, V y VI del vector MVA y todavía más preferentemente en la delección III (Meyer *et al.*, J. Gen. Virol. 72:1031-1038, 1991; Sutter *et al.*, Vaccine 12:1032-1040, 1994).

Los retrovirus presentan la propiedad de infectar, en la mayoría de casos de integrarse en, células en división y a este respecto resultan particularmente apropiados para la utilización en relación al cáncer. Un retrovirus recombinante según la invención generalmente contiene las secuencias LTR, una región de encapsidación y la secuencia de nucleótidos según la invención, que se encuentra bajo el control de la LTR retrovítica o de un promotor interno, tal como aquellos descritos posteriormente. El retrovirus recombinante puede derivarse de un retrovirus de cualquier origen (murino, primate, felino, humano, etc.) y en particular de M0MuLV (virus de la leucemia murina de Moloney), MVS (virus del sarcoma murino) o retrovirus murino de Friend (Fb29). Se propaga en una línea celular de encapsidación que es capaz de suministrar en trans los polipéptidos víricos gag, pol y/o env que resultan necesarios para constituir una partícula vírica. Dichas líneas celulares se encuentran descritas en la literatura (PA317, Psi CRIP GP + Am-12, etc.). El vector retrovítico según la invención puede contener modificaciones, en particular en las LTRs (sustitución de la región promotora por un promotor eucariótico) o la región de encapsidación (sustitución por una región de encapsidación heteróloga, por ejemplo el tipo VL30) (ver las solicitudes francesas nº 94/08300 y nº 97/05203).

Asimismo, resulta preferida la utilización de un vector adenovítico que carezca de la totalidad o de parte de por lo menos una región que resulte esencial para la replicación y que se selecciona de entre las regiones E1, E2, E4 y L1-L5, con el fin de evitar que se propague el vector dentro del organismo huésped o en el medio ambiente. Resulta preferente una delección de la región E1. Sin embargo, puede combinarse con una o más modificaciones/delecciones diferentes que afectan, en particular, a la totalidad o a parte de las regiones E2, E4 y/o L1-L5, en el grado de que las funciones esenciales defectivas se complementan en trans por medio de una línea celular complementaria y/o un virus ayudante. A este respecto, resulta posible utilizar vectores de segunda generación del estado de la técnica (ver, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional WO-A-94/28152 y WO-A-97/04119). A título de ilustración, la delección de la parte principal de la región E1 y de la unidad transcripcional E4 resulta muy particularmente ventajosa. Con el fin de incrementar las capacidades de clonación, el vector adenovítico puede carecer adicionalmente de la totalidad o de parte de la región E3 no esencial. Según otra alternativa, resulta posible utilizar un vector adenovítico mínimo que conserve las secuencias que resultan esenciales para la encapsidación, es decir las ITRs (repeticiones terminales invertidas) 5' y 3' y la región de encapsidación. Son conocidos los diversos vectores adenovíticos y las técnicas para la preparación de los mismos (ver, por ejemplo, Graham y Prevec, en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 7, páginas 109-128, 1991; editor: E.J. Murey, The Human Press mc).

Además, el origen del vector adenovítico según la invención puede variar tanto desde el punto de vista de la especie como desde el punto de vista del serotipo. El vector puede derivarse del genoma de un adenovirus de origen humano o animal (canino, aviar, bovino, murino, ovino, porcino, de simio, etc.) o de un híbrido que comprende fragmentos de genoma adenovítico de por lo menos dos orígenes diferentes. Puede hacerse mención más particular de los adenovirus CAV-1 o CAV-2 de origen canino, de los adenovirus DAV de origen aviar o de los adenovirus Bad de tipo 3 de origen bovino (Zakharchuk *et al.*, Arch. Virol. 128:171-176, 1993; Spibey y Cavanagh, J. Gen. Virol. 70:165-172, 1989; Jouvenne *et al.*, Gene 60:21-28, 1987; Mittal *et al.*, J. Gen. Virol. 76:93-102, 1995). Sin embargo, resulta preferente un vector adenovítico de origen humano que se deriva preferentemente de un adenovirus de serotipo C, en particular un adenovirus de serotipo C de tipo 2 ó 5.

La expresión "competente para la replicación tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un vector vírico capaz de replicarse en una célula huésped en ausencia de ninguna transcomplementación. En el contexto de la presente invención, este término también comprende vectores adenovirus de replicación selectiva o condicionalmente replicativos que se manipulan para que se repliquen mejor o de manera selectiva en el cáncer o en células huésped hiperproliferativas.

Según una forma de realización preferida de la invención, el vector competente para la replicación es un vector adenovítico competente para la replicación. Estos vectores adenovíticos competentes para la replicación son bien conocidos por el experto en la materia. Entre estos, los vectores adenovíticos delecionados en la región E1b codificante del inhibidor P53 de 55kD, tal como el virus ONYX-015 (Bischoff *et al.*, 1996; Heise *et al.*, 2000; patente WO nº 94/18992), resultan particularmente preferentes. De acuerdo con lo anterior, este virus puede utilizarse para infectar selectivamente y eliminar las células neoplásicas deficientes en p53. Un experto ordinario en la materia también puede mutar y alterar el gen del inhibidor p53 en el adenovirus 5 o en otros virus de acuerdo con las técnicas establecidas. También pueden utilizarse en la presente invención vectores adenovíticos delecionados en la región de unión E1A Rb. Por ejemplo, el virus Delta24, que es un adenovirus mutante que porta una delección de 24 pares de bases en la región E1A (Fueyo *et al.*, 2000). Delta24 presenta una delección en la región de unión de Rb y no se une a Rb. Por lo tanto, la replicación del virus mutante resulta inhibida por Rb en una célula normal. Sin embargo, si Rb resulta inactivado y la célula se convierte en neoplásica, Delta24 deja de ser inhibido. Por el contrario, el virus mutante se replica eficientemente y lisa la célula deficiente en Rb.

Puede generarse *in vitro* en *Escherichia coli* (*E. coli*) un vector adenovítico según la presente invención mediante ligación o recombinación homóloga (ver, por ejemplo, la solicitud internacional WO nº A-96/17070) o mediante recombinación en una línea celular complementaria.

Los elementos requeridos para la expresión consisten de todos los elementos que permiten que la secuencia de nucleótidos se transcriba en ARN y que el ARNm se traduzca en el polipéptido. Estos elementos comprenden, en particular, un promotor que puede ser regulable o constitutivo. Naturalmente el promotor es adecuado para el vector seleccionado y la célula huésped. Son ejemplos que pueden mencionarse los promotores eucarióticos de los genes PGK (fosfoglicerato quinasa), MT (metalotioneína; McIvor *et al.*, Mol. Cell Biol. 7:838-848, 1987), antitripsina α -1,

CFTR, surfactante, inmunoglobulina, β -actina (Tabin *et al.*, Mol. Cell Biol. 2:426-436, 1982) y SRa (Takebe *et al.*, Mol. Cell Biol. 8:466-472, 1988), el promotor temprano del virus SV40 (virus del simio), la LTR de RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor TK de HSV-I, el promotor temprano del virus CMV (citomegalovirus), los promotores p7.5K, pH5R, pK1L, p28 y p11 del virus Vaccinia, y los promotores adenovíricos E1A y MLP. El promotor también
 5 puede ser un promotor que estimule la expresión en un tumor o en una célula de cáncer. Puede hacerse mención particular de los promotores del gen MUC-I, que se sobreexpresa en los cánceres de mama y de próstata (Chen *et al.*, J. Clin. Invest. 96:2775-2782, 1995) del gen CEA (antígeno embrionario de carcinoma), que se sobreexpresa en los cánceres de colon (Schrewe *et al.*, Mol. Cell. Biol. 10:2738-2748, 1990), del gen tirosinasa, que se sobreexpresa en los melanomas (Vile *et al.*, Cancer Res. 53:3860-3864, 1993), del gen ERBB-2, que se sobreexpresa en los cánceres de
 10 mama y pancreático (Harris *et al.*, Gene Therapy 1:170-175, 1994) y del gen α -fetoproteína, que se sobreexpresa en el cáncer de hígado (Kanai *et al.*, Cancer Res. 57:461-465, 1997). El promotor temprano del citomegalovirus (CMV) resulta muy particularmente preferente.

Sin embargo, en el caso de que se utilice un vector derivado de un virus Vaccinia (tal como, por ejemplo, un vector
 15 MVA), resulta particularmente preferido el promotor 7.5K del gen de la timidina quinasa.

Los elementos necesarios además pueden incluir elementos adicionales que mejoran la expresión de la secuencia de nucleótidos según la invención o el mantenimiento de la misma en la célula huésped. Pueden mencionarse en particular las secuencias de intrón, las secuencias de señal de secreción, las secuencias de localización nuclear, los
 20 sitios para el reinicio de traducción del tipo IRES, las secuencias poliA de terminación de la transcripción, los líderes tripartito y los orígenes de replicación. Estos elementos son conocidos por el experto en la materia.

El vector recombinante según la invención también puede comprender uno o más genes de interés adicionales, resultando posible situar estos genes bajo el control de los mismos elementos reguladores (casete policistrónico)
 25 o de elementos independientes. Los genes que en particular pueden mencionarse son los genes codificantes de las interleuquinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-10 e IL-12, los interferones, el factor de necrosis tumoral (TNF), los factores estimuladores de colonias (CSF), en particular GM-CSF y los factores que actúan sobre la angiogénesis (por ejemplo PAI-1, que se refiere al inhibidor del activador del plasminógeno). En una forma de realización particular el vector recombinante según la invención comprende el gen de interés codificante de IL-2 o codificante de interferón γ (INF γ).
 30 También resulta posible contemplar la combinación de la secuencia de nucleótidos según la invención con otros genes suicidas, tales como el gen TK de HSV-1, el gen de la ricina, el gen de la toxina del cólera, etc.

La presente solicitud describe asimismo una partícula vírica que comprende un vector recombinante según la invención. Este tipo de partícula vírica puede generarse a partir de un vector vírico utilizando cualquier técnica con-
 35 vencional en el campo de la técnica. La partícula vírica se propaga en una célula complementaria que resulta adecuada a las deficiencias del vector. Con respecto a un vector adenovírico, se utiliza, por ejemplo, la línea celular 293, establecida utilizando células de riñón embrionario humano y que complementa eficientemente la función E1 (Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) de la línea celular A549-E1 (Imier *et al.*, Gene Therapy 3:75-84, 1996) o de una línea celular que permite la doble complementación (Yeh *et al.*, J. Virol. 70:559-565, 1996; Krougliak y Graham,
 40 Human Gene Therapy 6:1575-1586, 1995; Wang *et al.*, Gene Therapy 2:775-783, 1995; solicitud internacional WO n° 97/04119). También resulta posible utilizar virus ayudantes para complementar por lo menos parcialmente las funciones defectivas. Se entiende que una célula complementaria es una célula que es capaz de suministrar en trans los factores tempranos y/o tardíos que resultan necesarios para encapsidar el genoma vírico en una cápside vírica con el fin de generar una partícula vírica que contiene el vector recombinante. Dicha célula puede no ser capaz de comple-
 45 mentar todas las funciones defectivas del vector por sí solo y, en este caso, puede transfectarse/transducirse con un vector/virus ayudante que suministre las funciones adicionales.

La solicitud describe asimismo un procedimiento para preparar una partícula vírica, procedimiento en el que:

- 50 (i) se introduce un vector recombinante según la invención en una célula complementaria que es capaz de complementar dicho vector en trans, de manera que se obtiene una célula complementaria transfectada,
- (ii) dicha célula complementaria transfectada se cultiva bajo condiciones que resultan apropiadas para permitir la producción de dicha partícula vírica, y
- 55 (iii) dicha partícula vírica se recupera a partir del cultivo celular.

Aunque la partícula vírica evidentemente puede recuperarse del sobrenadante de cultivo, también puede recuperarse a partir de las células. Uno de los procedimientos utilizados comúnmente consiste en lisar las células por medio
 60 de ciclos consecutivos de congelación/descongelación con el fin de recoger los viriones en el sobrenadante de lisis. A continuación, los viriones pueden amplificarse y purificarse utilizando las técnicas del campo de la técnica (método cromatográfico, método de ultracentrifugación, en particular a través de un gradiente de cloruro de cesio, etc.).

Asimismo, la presente invención se refiere a una composición que comprende un kit de partes, un vector recombi-
 65 nante o una partícula vírica según la invención en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un kit de partes según la invención está más específicamente destinado al tratamiento preventivo o curativo de enfermedades por medio de la terapia génica y presenta el objetivo más específico de las enfermedades proliferati-

vas (cánceres, tumores, restenosis, etc.) y de las enfermedades de origen infeccioso, en particular de origen vírico (inducidas por virus de la hepatitis B o C, VIH, herpes, retrovirus, etc.).

Puede fabricarse convencionalmente un kit de partes según la invención con vistas a su administración local, parenteral o por vía digestiva. En particular, se combina una cantidad terapéuticamente efectiva del agente terapéutico o profiláctico con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Resulta posible contemplar un gran número de vías de administración. Entre los ejemplos que pueden mencionarse se encuentran las vías intragástrica, subcutánea, intracardíaca, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, intranasal, intrapulmonar e intratraqueal. En el caso de estas tres últimas formas de realización, resulta ventajoso que la administración tenga lugar por medio de un aerosol o mediante instilación. La administración puede tener lugar en forma de una dosis única o de una dosis que se repita en una o más ocasiones tras un intervalo de tiempo particular. La vía de administración y dosis apropiadas varían dependiendo de una diversidad de parámetros, por ejemplo el individuo, la enfermedad que debe tratarse o el gen o genes de interés que deben transferirse. Las preparaciones basadas en partículas víricas según la invención pueden formularse en forma de dosis de entre 10^4 y 10^{14} pfu (unidades formadoras de placa), ventajosamente de entre 10^5 y 10^{13} pfu, preferentemente de entre 10^6 y 10^{12} pfu, más preferentemente de entre 10^9 y 10^{10} en el caso de que se utilicen partículas adenovíricas, y de entre 10^6 y 10^7 en el caso de que se utilicen partículas de MVA. Respecto al vector recombinante según la invención, resulta posible contemplar dosis comprendidas entre 0,01 y 100 mg de ADN, preferentemente de entre 0,05 y 10 mg, muy particularmente preferentemente de entre 0,5 y 5 mg.

La formulación también puede incluir un diluyente, un adyuvante o un excipiente que resulte aceptable desde el punto de vista farmacéutico, así como agentes solubilizantes, estabilizantes y conservantes. En el caso de una administración inyectable, resulta preferida una formulación en una solución acuosa, no acuosa o isotónica. Puede presentarse en forma de dosis única o de multidosis, en forma líquida o seca (polvos, liofilizado, etc.) que puede reconstituirse en el momento de la utilización utilizando un diluyente apropiado. La formulación también puede comprender cantidades apropiadas de profármacos.

Asimismo, la presente invención se refiere a la utilización terapéutica o profiláctica de un kit de partes o de un vector recombinante según la invención para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia génica. Según una primera posibilidad, el medicamento puede administrarse directamente *in vivo* (por ejemplo mediante inyección intravenosa, en un tumor accesible, en los pulmones por medio de un aerosol, en el sistema vascular utilizando un catéter apropiado, etc.). También resulta posible adoptar el enfoque *ex vivo*, que consiste en extraer células del paciente (células madre de la médula ósea, linfocitos de sangre periférica, células musculares, etc.), transfectarlas o infectarlas *in vitro* de acuerdo con las técnicas del campo de la técnica y después readministrarlas en el paciente. Una utilización preferida consiste en tratar o prevenir cánceres, tumores y enfermedades que resultan de la proliferación celular no deseada. Las aplicaciones concebibles que pueden indicarse son los cánceres de mama, de útero (en particular aquellos inducidos por los virus del papiloma), de próstata, de pulmón, de vejiga, de hígado, de colon, de páncreas, de estómago, de esófago, de laringe, del sistema nervioso central (por ejemplo el glioblastoma) y de la sangre (linfomas, leucemia, etc.). También puede utilizarse en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, por ejemplo con el fin de inhibir o retrasar la proliferación de las células de músculo liso de la pared del vaso sanguíneo (restenosis). Finalmente, en el caso de las enfermedades infecciosas, resulta posible concebir que el medicamento se aplique para el SIDA.

La solicitud describe asimismo un procedimiento para tratar enfermedades mediante terapia génica, caracterizado porque se administra un kit de partes, un vector recombinante, una partícula vírica o una célula huésped según la invención, en un organismo o célula huésped que necesita de dicho tratamiento.

El fármaco que comprende un grupo nucleobase o un precursor del mismo puede administrarse de acuerdo con la práctica estándar (por ejemplo *per os*, sistemáticamente). A título de ilustración, con respecto a 5-FU, resulta posible utilizar una dosis de entre 50 y 500 mg/kg/día, resultando preferente una dosis de 200 mg/kg/día. En el contexto de la presente invención, el profármaco se administra de acuerdo con la práctica estándar (por ejemplo *per os*, sistemáticamente), teniendo lugar la administración antes, concomitantemente o posteriormente a la administración de una secuencia de ácidos nucleicos según la invención. Resulta preferida la vía oral. Resulta posible administrar una única dosis de profármaco o dosis que se repitan durante un tiempo suficientemente prolongado para permitir que el metabolito tóxico sea producido dentro del organismo o célula huésped.

Además, el kit de partes o el procedimiento según la invención pueden combinarse con una o más sustancias que potencien el efecto citotóxico del fármaco que comprende un grupo nucleobase. En particular puede hacerse mención a fármacos que inhiben los enzimas de la ruta de biosíntesis *de novo* de las pirimidinas (por ejemplo aquellos indicados posteriormente), fármacos tales como la leucovorina (Waxman *et al.*, Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18:685-692, 1982) que, en presencia del producto del metabolismo del 5-FU (5-FdUMP), incrementan la inhibición de la timidilato sintasa, resultando en una reducción del pool de dTMP, que resulta necesario para la replicación, y finalmente fármacos tales como el metotrexato (Cadman *et al.*, Science 250:1135-1137, 1979), que, mediante la inhibición de la dihidrofolato reductasa y el incremento del pool de PRPP (fosforibosilpirofosfato), provoca un incremento de la incorporación del 5-FU en el ARN celular.

El kit de partes o procedimiento según la invención puede combinarse con una o más sustancias efectivas en la terapia anticáncer. El kit de partes o procedimiento según la invención también pueden resultar útil en combinación con una radioterapia.

La Figura 1 muestra una actividad antitumoral de la combinación de adenovirus y 5-FC a concentraciones de 125 y 50 mg/kg/día sobre el crecimiento del xenoinjerto de cáncer de colon LoVo en ratón Swiss desnudos. Se establecieron tumores mediante implante s.c. de 5×10^6 células en ratones desnudos. En tumores palpables, los animales se inocularon intratumoralmente 3 veces con Ad-vacío (A), Ad-FCU1 (B) o Ad-FCY2FCU1 (C) y se trataron durante 3 semanas con administraciones *per os* de 5-FC. Con Ad-vacío (A) no se observaron diferencias en las curvas de crecimiento en ausencia y en presencia de 5-FC ($p > 0,05$). Con Ad-FCU1 (B) no se observó ninguna diferencia significativa en las curvas de crecimiento en presencia y en ausencia de 5-FC únicamente a la concentración de 125 mg/kg/día ($p < 0,05$). Con Ad-FCY2FCU1 (C) se observó una diferencia significativa en las curvas de crecimiento sin 5-FC y con 5-FC sistémicas a las concentraciones de 125 y 50 mg/kg/día ($p < 0,05$).

Ejemplos

Construcción de un adenovirus que expresa FCY2 de la región E1

Se amplificó un gen completo de purina-citosina permeasa de levadura (FCY2, 1.599 pb) del plásmido pAJ14 (Bloch *et al.*, 1992) como molde utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos SEC ID nº 3: 5'-TAACGATCTCGAGCCATGGTGGGAAGAGGGAAATAATGTTTACG-3' (OTG14626, correspondiente al extremo 5' de la secuencia codificante de FCY2 aunque introduciendo una secuencia de consenso Kozak en sustitución de Leu en la posición 2 por un Val e incorporando un sitio de restricción XhoI cadena arriba del codón de inicio), y la SEC ID nº 4: 5'-CCCTAATCACGCGTTCCTAACGACCGAAGTATTTTAAT-3' (OTG14627, correspondiente al extremo 3' y con inserción de un sitio de restricción MluI cadena abajo del codón de parada). Se digirió el producto de PCR con XhoI y MluI y se subclonó en los sitios correspondientes del vector de expresión de mamífero pCIneo (Promega), generando el plásmido pTG15829. Las secuencias de pTG15829 revelaron una mutación silenciosa en el nucleótido +1.272 (G a A) en el marco de lectura abierto del gen FCY2. Del plásmido pTG15829, se insertó el fragmento XhoI-MluI que contenía el gen FCY2 en el vector de transferencia pTG13387 cortado por los mismos enzimas, generando el vector de transferencia pTG15857. Se generó el vector adenovírico Ad-FCY2 (pTG15895) mediante recombinación homóloga en la cepa BJ5183 de *E. coli* entre el fragmento PacI-BstEII de pTG15857 y el vector pTG6624 linearizado con ClaI. La construcción final Ad-FCY2 (Ptg15895) contenía una delección en E3 (nucleótidos 28.592 a 30.470), mientras que la región E1 (nucleótidos 459 a 3.510) se sustituyó por el casete de expresión que contenía, de 5' a 3', el intensificador/promotor inmediato/temprano de CMV, un intrón quimérico β -globina humana/IgG, el gen FCY2 y la señal de poliadenilación bGH. Se generaron partículas adenovíricas que expresaban FCY2 (AdTG15895) mediante transfección de una línea celular complementaria de la función E1 (por ejemplo la línea PERC6).

Construcción de un adenovirus que expresa una unidad bicistrónica FCY2 IRES FCU1 de la región E1

Se aisló el fragmento NheI-NotI del plásmido pTG15829 que contenía el gen FCY2 y se introdujo en el vector pTG14347 (plásmido pTG4369p53FCU1, descrito en la patente de P53FCU1) linearizado con NheI-NotI. El plásmido pTG16055 obtenido de esta manera contenía, de 5' a 3', el gen FCY2, la secuencia IRES (sitio interno de entrada ribosómica) del ECMV (virus de la encefalomiocarditis) y el gen FCU1. Del plásmido pTG16055 se insertó el fragmento NheI-BamHI en el vector de transferencia pTG14799 (plásmido descrito en la patente de FCU1-8) cortado por los mismos enzimas, generando el vector de transferencia pTG16066. Se generó el vector adenovírico Ad-FCY2FCU1 (pTG16079) mediante recombinación homóloga en la cepa BJ5183 de *E. coli* entre el fragmento PacI-BstEII de pTG16066 y el vector pTG6624 linearizado por ClaI. La construcción final Ad-FCY2FCU1 (pTG16079) contenía una delección en E3 (nucleótidos 28.592 a 30.470), mientras que la región E1 (nucleótidos 459 a 3.510) se sustituyó por el casete de expresión que contenía, de 5' a 3', el intensificador/promotor inmediato-temprano de CMV, un intrón quimérico de β -globina humana/IgG, la unidad bicistrónica FCY2 IRES FCU1 y la señal de poliadenilación bGH. Se generaron las partículas adenovíricas que expresaban FCY2 IRES FCU1 (AdTG16079) mediante transfección de una línea celular complementaria de la función E1 (por ejemplo la línea PERC6).

Ensayos e incorporación de 5-fluorocitosina

Se infectó la línea celular tumoral humana A549 (ATCC CCL-185) con control, con un adenovirus vacío (AdTG15149) o con un adenovirus que expresa FCU1 (AdTG14800 descrito en la patente de FCU1-8) o FCY2 (AdTG15895) o FCY2 y FCU1 (AdTG160079). Las células (5×10^6) se infectaron a una MOI=20 en placas de 60 mm. Tras 24 horas, se midió la incorporación de 5-FC en las células transfectadas mediante técnicas convencionales de marcador. La tasa inicial de 5-FC (10 μ M, temperatura ambiente) se midió tras un periodo de incubación de 1 minuto y marcando con [3 H]5-FC a una concentración de 0,15 μ Ci/ml.

Brevemente, 24 horas después de la infección, las células se lavaron una vez con el tampón de transporte (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM y HEPES 10 mM, pH 7,5). Se iniciaron ensayos de incorporación mediante la adición de 2 ml de tampón de transporte que contenía 5-FC a una concentración de 10 μ M ([3 H]5-FC a una concentración de 0,15 μ Ci/ml). Al final de la incubación, se eliminó el marcaje extracelular mediante tres lavados rápidos con tampón de transporte helado. Las células se solubilizaron en 1 ml de SDS al 5% para la cuantificación de la radioactividad mediante recuento de centelleo líquido.

TABLA 1

Incorporación de 5-FC en células A549 transfectadas

Se midió la incorporación de 5-FC utilizando tampón de transporte que contenía 10 μ M de 5-FC.

Cada valor representa la media de tres experimentos independientes $\pm$ SD.

Vector	Incorporación de 5-FC (pmoles/min/5x10 ⁶ células)
Sin vector	7,97 $\pm$ 3,76
Ad-vacío (AdTG15149)	9,74 $\pm$ 3,31
Ad-FCU1 (AdTG14800)	13,28 $\pm$ 5,74
Ad-FCY2 (AdTG15895)	38,94 $\pm$ 7,61
Ad-FCY2FCU1 (AdTG16079)	77 $\pm$ 28,7

Los resultados presentados en la Tabla 1 demuestran un incremento del transporte de 5-FC en las células infectadas por adenovirus que expresan *FCY2* (AdFCY2 y AdFCY2FCU1). Estos resultados indican que *FCY2* de levadura, expresado en células humanas, codifica un transportador funcional de 5-FC.

Sensibilidad celular in vitro a 5-FC

Se compararon las células tumorales infectadas con los diferentes adenovirus para su sensibilidad hacia 5-FC. Se infectó la línea celular tumoral humana A549 (ATCC CCL-185) con control, con un adenovirus vacío (AdTG15149), con un adenovirus que expresa FCU1 (AdTG14800 descrito en la patente de FCU1-8) o FCY2 (AdTG15895) o FCY2 y FCU1 (AdTG16079). Las células se infectaron a una MOI de 1 y después cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de 5-FC. Tras 6 días de cultivo, se determinó la viabilidad de las células utilizando azul tripán. Los valores de LD₅₀ para 5-FC indicados en la Tabla 2 son las medias de cuatro valores.

Experimentos in vivo

El objetivo del presente estudio era comparar la actividad antitumoral de Ad-FCU1 recombinante y de Ad-FCY2FCU1 en combinación con la administración *per os* de 5-fluorocitosina (5-FC) a una concentración de 125 ó 50 mg/kg/día en ratones desnudos que portaban tumores de colon humano LoVo.

Las células LoVo se inyectaron subcutáneamente (s.c.) en los costados de ratones desnudos Swiss. En cada animal se implantaron 5x10⁶ células LoVo suspendidas en 100 ml de PBS. Al alcanzar los tumores 30 a 50 mm³, los ratones se aleatorizaron de manera ciega y se trataron con los vectores indicados a una dosis de 1,108 IU. Los vectores (suspendidos en 100 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM) se inyectaron directamente en el tumor los días 12, 15 y 18 tras el implante del tumor. A partir del día 12, se administró 5-FC mediante sonda oral a una concentración de 62,5 mg/kg/día (0,6 ml de 5-FC al 0,25% en agua) o de 25 mg/kg/día (0,6 ml de 5-FC al 0,1% en agua) dos veces al día durante 3 semanas. Se midió el tamaño tumoral en dos dimensiones utilizando un calibrador. El volumen tumoral se calculó en mm³ utilizando la fórmula siguiente: (p6)(longitud x anchura²).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney y el programa Statistica 6.1 (StatSoft, Inc.). Se consideró que p<0,05 era el nivel estadísticamente significativo.

La administración de 5-FC a una concentración de 125 mg/kg/día, la inyección de Ad-FCU1 y de Ad-FCY2FCU1 resultó en una supresión estadísticamente significativa del crecimiento tumoral (fig. 1B,C). Este efecto antitumoral era específico de FCU1/5-FC debido a que la infección con Ad-vacío, que no induce actividad de FCU1, no redujo significativamente el tamaño tumoral en presencia de 5-FC (fig. 1A). A una dosis más baja de 5-FC (50 mg/kg/día), se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral tras la administración de Ad-FCY2FCU1 (fig. 1C), mientras que no se observó ninguna modificación del crecimiento tumoral con Ad-FCU1. Este resultado indica que la combinación de FCY2 y FCU1 resulta significativamente más efectiva que FCU1 solo y sugiere que el sistema FCY2FCU1/5-FC resulta más eficiente que el sistema FCU1/5-FC en un enfoque de terapia génica para el cáncer.

TABLA 2

Valores de LD_{50} para 5-FC de células A549 transducidas por adenovirus

Vector	LD_{50} (μM)
Control	>1.000
Ad-vacío (AdTG15149)	>1.000
Ad-FCU1 (AdTG14800)	50
Ad-FCY2 (AdTG15895)	>1.000
Ad-FCY2FCU1 (AdTG16079)	20

Estos resultados demuestran que la coexpresión de los genes FCY2 y FCU1 del vector adenovírico (AdTG16079) sensibiliza las células frente a 5-FC más fuertemente que la expresión del gen FCU1 (AdTG14800). Esta mayor sensibilidad a 5-FC resulta de la incorporación de 5-FC codificado por el gen *FCY2*. Mediante la utilización de células infectadas por Ad-FCY2 (AdTG15895), no se observó ningún efecto antiproliferativo, indicando que la administración únicamente de *FCY2*, en ausencia de actividad de citosina desaminasa, resulta insuficiente para un protocolo efectivo de terapia antitumoral.

REIVINDICACIONES

1. Kit de partes para el tratamiento del cáncer y/o de enfermedades víricas en vertebrados y más particularmente en el ser humano, que comprende:
 - un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase, y
 - una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen codificante de una permeasa implicada en la transferencia de dicho precursor de la misma a través de la membrana celular, y
 - una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un gen suicida codificante de una proteína capaz de convertir dicho precursor en un fármaco que comprende un grupo nucleobase.
2. Kit de partes según la reivindicación 1, en el que dicho fármaco que comprende un grupo nucleobase se selecciona de entre el grupo constituido por citarabina, gemcitabina, capecitabina, fludarcibina, cladribina, troxacitabina, clofarabina, azidotimidina (AZT), didanosina (ddl), zalcitabina (ddC), estavudina (d4T), fluorometileno desoxicitidina (FMdC) y lamivudina, floxuridina (FUdR), 5-fluorouracilo (5-FU), tioguanina, mercaptopurina, aciclovir, valaciclovir, fanciclovir y ganciclovir.
3. Kit de partes según una de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha permeasa es una purina o citosina permeasa de *S. cerevisiae*.
4. Kit de partes según la reivindicación 3, en el que dicha permeasa se selecciona de entre el grupo constituido por FCY2 y Fur4 y análogos de los mismos.
5. Kit de partes según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho gen suicida se selecciona de entre el grupo constituido por genes codificantes de una proteína que presenta una actividad de citosina desaminasa, una actividad de timidina quinasa, una actividad de uracilfosforibosil transferasa, una actividad de purina nucleósido fosforilasa y/o una actividad de timidilato quinasa.
6. Kit de partes según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho gen suicida codifica una proteína que presenta una actividad de citosina desaminasa.
7. Kit de partes según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho gen suicida codifica una proteína que presenta por lo menos una actividad de citosina desaminasa y una actividad de fosforibosil transferasa.
8. Kit de partes según la reivindicación 6, en el que el gen suicida se selecciona de entre el grupo constituido por CodA, upp, FUR1, FCY1 y FUR1Δ105.
9. Kit de partes según la reivindicación 7, en el que dicha proteína es una proteína de fusión en la que se fusiona en fase un primer polipéptido que muestra una actividad de UPRTasa o de CDasa con un segundo polipéptido, mostrando dicho segundo polipéptido una actividad de CDasa o de UPRTasa, respectivamente.
10. Kit de partes según la reivindicación 7, en el que dicho gen suicida comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo constituido por upp, FUR1 y FUR1Δ105, y una segunda secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre el grupo constituido por CodA y FCY1.
11. Kit de partes según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase se selecciona de entre el grupo constituido por azidotimidina (AZT), ganciclovir (GCV), 5-fluorocitosina (5-FC), 5-fluorouracilo (5-FU), 6-metilpurina desoxiribonucleósido, ganciclovir éster de ácido elaidico, penciclovir, aciclovir, valaciclovir, (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina, zidovudina, 2'-exo-metanocarbatiimidina.
12. Kit de partes según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha secuencia de ácidos nucleicos está insertada en un vector recombinante de origen plasmídico o vírico.
13. Kit de partes según la reivindicación 1, en el que dichas secuencias de ácidos nucleicos están insertadas en el mismo vector recombinante.
14. Kit de partes según la reivindicación 1, en el que dichas secuencias de ácidos nucleicos están insertadas en vectores recombinantes diferentes.
15. Vector recombinante que comprende un gen codificante de una permeasa implicada en la transferencia de dicho precursor de la misma a través de la membrana celular y un gen suicida codificante de una proteína capaz de convertir un precursor de un fármaco que comprende un grupo nucleobase en un fármaco que comprende un grupo nucleobase.

ES 2 320 157 T3

16. Vector recombinante según la reivindicación 15, **caracterizado** porque dicho vector se selecciona de entre el grupo constituido por vectores plasmídicos y víricos, en caso apropiado combinado con una o más sustancias que mejoran la eficacia transfeccional y/o la estabilidad del vector.

5 17. Vector recombinante según la reivindicación 16, en el que dicha sustancia que mejora la eficacia transfeccional y/o la estabilidad del vector se selecciona de entre el grupo constituido por lípidos catiónicos, polímeros catiónicos, lisofosfolípidos y polipéptidos.

10 18. Vector recombinante según la reivindicación 16, en el que dicho vector es un vector vírico que se deriva de un virus de la viruela, de un adenovirus, de un retrovirus, de un virus herpes, de un alfavirus, de un virus espumoso o de un virus adenoasociado.

15 19. Vector recombinante según la reivindicación 18, en el que dicho vector se deriva de un virus Vaccinia Ankara modificado (MVA).

20 20. Vector recombinante según la reivindicación 19, en el que dicho gen codificante de una permeasa y dicho gen suicida están insertados en un sitio de una delección de origen natural dentro del genoma de MVA seleccionada de entre el grupo constituido por las delecciones I, II, III, IV, V y VI.

21. Vector recombinante según la reivindicación 20, en el que dichos genes están insertados en el sitio de la delección de origen natural III.

22. Vector recombinante según la reivindicación 18, en el que dicho vector es un vector adenovírico que carece asimismo de la totalidad o de parte de la región E3 no esencial.

23. Composición farmacéutica que comprende un kit de partes según una de las reivindicaciones 1 a 14 o un vector recombinante según una de las reivindicaciones 15 a 22.

30 24. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 23 para la preparación de un medicamento.

25. Utilización de una composición farmacéutica según la reivindicación 23 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

Fig. 1 A

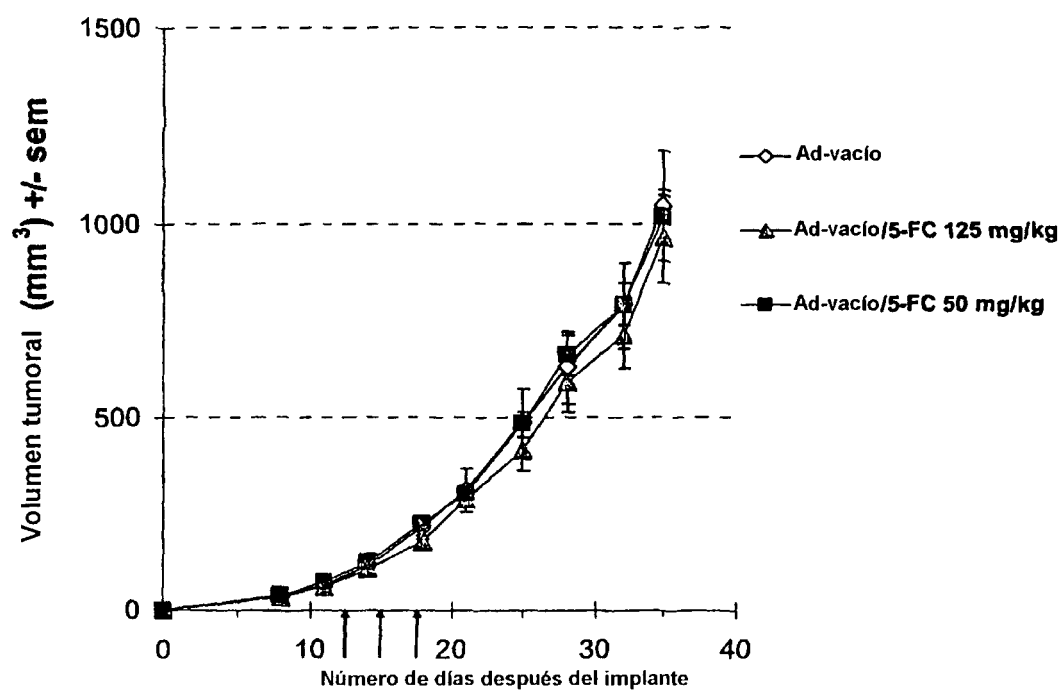


Fig. 1 B

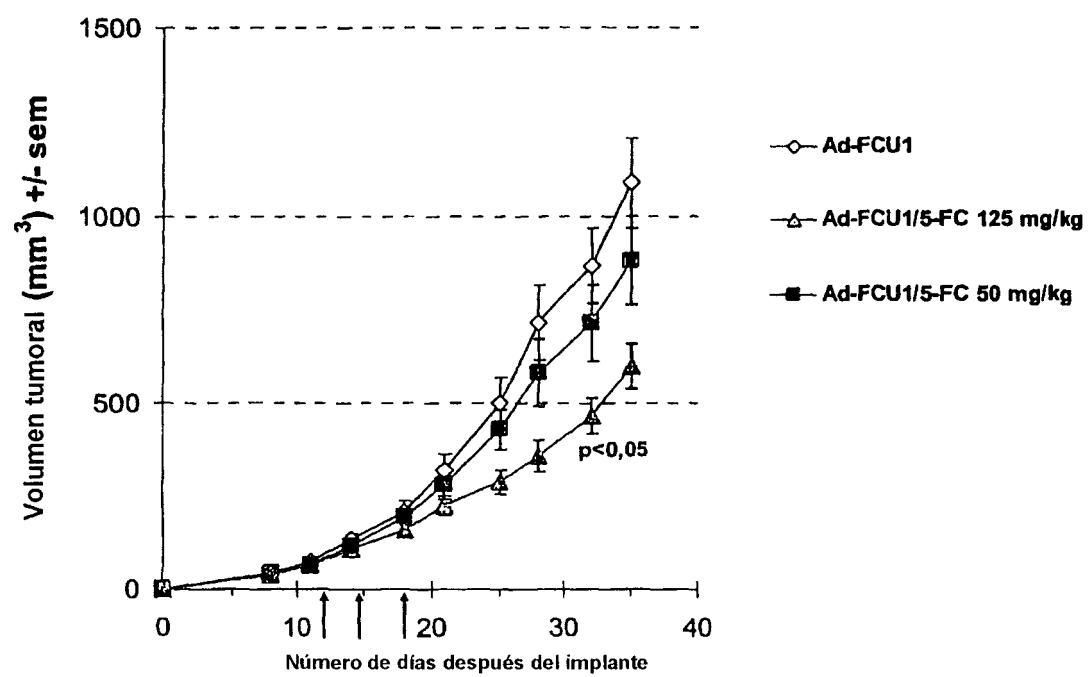
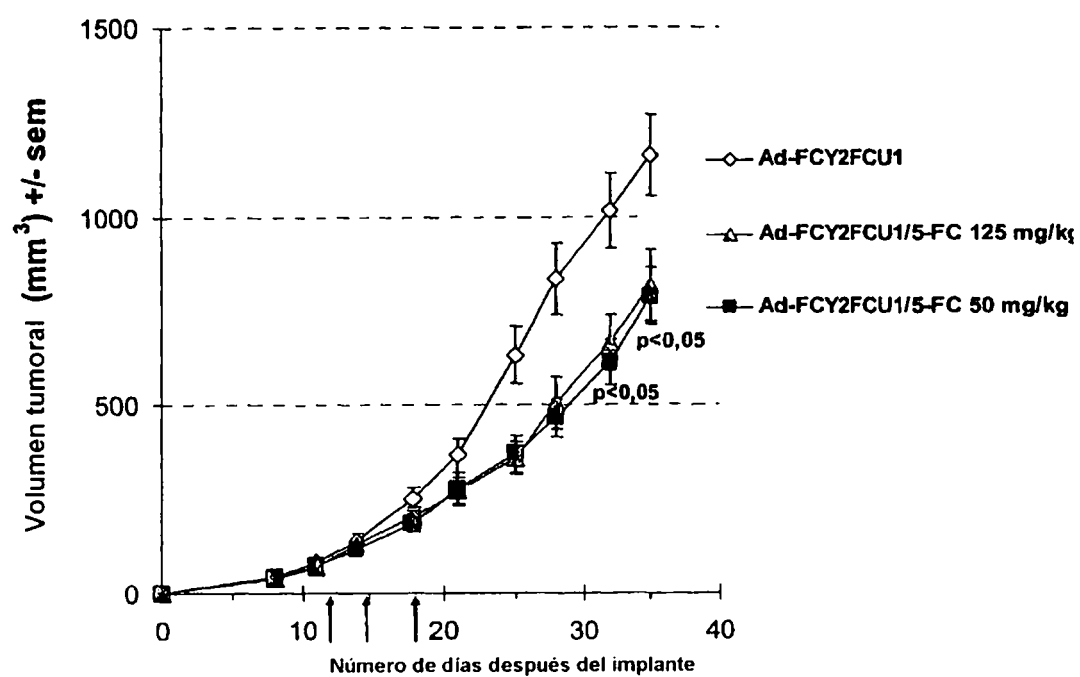


Fig. 1 C



ES 2 320 157 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TRANSGENE S.A.

5 <120> Kit de partes diseñado para poner en práctica un tratamiento antitumoral o antivírico en un mamífero.

<130> 348 657/D 22887

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1

<211> 533

<212> PRT

20 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

25	Met	Val	Glu	Glu	Gly	Asn	Asn	Val	Tyr	Glu	Ile	Gln	Asp	Leu	Glu	Lys	1	5	10	15
	Arg	Ser	Pro	Val	Ile	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Glu	Lys	Lys	Val	Ala	20	25	30	
	Ala	Ser	Glu	Thr	Phe	Thr	Ala	Thr	Ser	Glu	Asp	Asp	Gln	Gln	Tyr	Ile	35	40	45	
30	Val	Glu	Ser	Ser	Glu	Ala	Thr	Lys	Leu	Ser	Trp	Phe	His	Lys	Phe	Phe	50	55	60	
	Ala	Ser	Leu	Asn	Ala	Glu	Thr	Lys	Gly	Val	Glu	Pro	Val	Thr	Glu	Asp	65	70	75	
35	Glu	Lys	Thr	Asp	Asp	Ser	Ile	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Met	Trp	Phe	Ser	85	90	95	
	Ala	Asn	Met	Val	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Pro	Met	100	105	110	
40	Val	Phe	Gly	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Ser	Val	Leu	Val	Ile	Ile	Phe	Phe	115	120	125	
	Asn	Ile	Met	Gly	Leu	Ile	Phe	Val	Ala	Phe	Phe	Ser	Val	Phe	Gly	Ala	130	135	140	
45	Glu	Leu	Gly	Leu	Arg	Gln	Met	Ile	Leu	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Gly	Asn	145	150	155	
	Val	Thr	Ala	Arg	Ile	Phe	Ser	Leu	Ile	Asn	Val	Ile	Ala	Cys	Val	Gly	165	170	175	
50	Trp	Gly	Ile	Val	Asn	Thr	Ser	Val	Ser	Ala	Gln	Leu	Leu	Asn	Met	Met	180	185	190	
	Asn	Glu	Gly	Ser	Gly	His	Val	Cys	Pro	Ile	Trp	Ala	Gly	Cys	Leu	Ile	195	200	205	

55

60

65

ES 2 320 157 T3

	Ile	Ile	Gly	Gly	Thr	Val	Leu	Val	Thr	Phe	Phe	Gly	Tyr	Ser	Val	Ile	
	210						215					220					
5	His	Ala	Tyr	Glu	Lys	Trp	Ser	Trp	Val	Pro	Asn	Phe	Ala	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
	Val	Ile	Ile	Ala	Gln	Leu	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Gly	Glu	
					245					250					255		
10	Trp	Val	Gly	Gly	Ala	Thr	Thr	Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Ser	Phe	Gly	Ser	
					260				265					270			
	Ser	Ile	Phe	Gly	Phe	Ala	Ala	Gly	Trp	Thr	Thr	Tyr	Ala	Ala	Asp	Tyr	
15			275					280					285				
	Thr	Val	Tyr	Met	Pro	Lys	Ser	Thr	Asn	Lys	Tyr	Lys	Ile	Phe	Phe	Ser	
		290					295					300					
20	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Ala	Phe	Pro	Leu	Phe	Phe	Thr	Met	Ile	Leu	Gly	
	305					310					315					320	
	Ala	Ala	Ser	Ala	Met	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Pro	Thr	Trp	Lys	Ala	Tyr	
25					325					330					335		
	Tyr	Asp	Lys	Asn	Ala	Met	Gly	Gly	Val	Ile	Tyr	Ala	Ile	Leu	Val	Pro	
				340					345					350			
30	Asn	Ser	Leu	Asn	Gly	Phe	Gly	Gln	Phe	Cys	Cys	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	
			355					360					365				
	Ser	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn	Ile	Pro	Asn	Met	Tyr	Thr	Val	Ala	Leu	Ser	
		370					375					380					
35	Ala	Gln	Ala	Leu	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Lys	Ile	Pro	Arg	Val	Val	Trp	
	385					390					395					400	
	Thr	Met	Ala	Gly	Asn	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Ile	Ser	Ile	Pro	Ala	Thr	
40					405					410					415		
	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Gly	Phe	Met	Glu	Asn	Phe	Met	Asp	Ser	Ile	Gly	Tyr	
				420					425					430			
45	Tyr	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ile	Ala	Ile	Ser	Cys	Ser	Glu	His	Phe	Phe	Tyr	
		435						440					445				
	Arg	Arg	Ser	Phe	Ser	Ala	Tyr	Asn	Ile	Asp	Asp	Trp	Asp	Asn	Trp	Glu	
		450					455					460					
50	His	Leu	Pro	Ile	Gly	Ile	Ala	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Gly	Ala	
	465					470					475					480	
	Phe	Gly	Val	Ala	Leu	Gly	Met	Cys	Gln	Thr	Tyr	Trp	Val	Gly	Glu	Ile	
55					485					490					495		
	Gly	Arg	Leu	Ile	Gly	Lys	Tyr	Gly	Gly	Asp	Ile	Gly	Phe	Glu	Leu	Gly	
					500				505					510			
60	Ala	Ser	Trp	Ala	Phe	Ile	Ile	Tyr	Asn	Ile	Leu	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu	
			515					520					525				
	Lys	Tyr	Phe	Gly	Arg												
					530												

65
 <210> 2
 <211> 633

ES 2 320 157 T3

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

5 <400> 2

	Met	Ala	Asp	Asn	Leu	Ser	Leu	His	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Lys	Arg	Leu	
	1				5					10					15		
10	Asn	Ser	Arg	Gln	Leu	Met	Glu	Ser	Ser	Asn	Glu	Thr	Phe	Ala	Pro	Asn	
				20					25					30			
	Asn	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Glu	Tyr	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Asn	Ile	Thr	
			35					40					45				
15	Thr	Glu	Val	Tyr	Glu	Ala	Ser	Ser	Phe	Glu	Glu	Lys	Val	Ser	Ser	Glu	
		50					55					60					
	Lys	Pro	Gln	Tyr	Ser	Ser	Phe	Trp	Lys	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Glu	Tyr	Val	
20						70					75					80	
	Val	Val	Asp	Lys	Ser	Ile	Leu	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Asp	Ser	Phe	Met	
					85					90					95		
25	Tyr	Asn	Gln	Asp	Leu	Lys	Pro	Val	Glu	Lys	Glu	Arg	Arg	Val	Trp	Ser	
				100					105					110			
	Trp	Tyr	Asn	Tyr	Cys	Tyr	Phe	Trp	Leu	Ala	Glu	Cys	Phe	Asn	Ile	Asn	
			115					120					125				
30	Thr	Trp	Gln	Ile	Ala	Ala	Thr	Gly	Leu	Gln	Leu	Gly	Leu	Asn	Trp	Trp	
		130					135					140					
	Gln	Cys	Trp	Ile	Thr	Ile	Trp	Ile	Gly	Tyr	Gly	Phe	Val	Gly	Ala	Phe	
		145				150					155					160	
35	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Arg	Val	Gly	Ser	Ala	Tyr	His	Leu	Ser	Phe	Pro	
					165				170						175		
	Ile	Ser	Ser	Arg	Ala	Ser	Phe	Gly	Ile	Phe	Phe	Ser	Leu	Trp	Pro	Val	
40				180					185					190			
	Ile	Asn	Arg	Val	Val	Met	Ala	Ile	Val	Trp	Tyr	Ser	Val	Gln	Ala	Tyr	
			195				200						205				
	Ile	Ala	Ala	Thr	Pro	Val	Ser	Leu	Met	Leu	Lys	Ser	Ile	Phe	Gly	Lys	
45		210					215					220					
	Asp	Leu	Gln	Asp	Arg	Ile	Pro	Asp	His	Phe	Gly	Ser	Pro	Asn	Ala	Thr	
		225				230					235					240	
50	Thr	Tyr	Glu	Phe	Met	Cys	Phe	Phe	Ile	Phe	Trp	Ala	Ala	Ser	Leu	Pro	
					245					250					255		
	Phe	Leu	Leu	Val	Pro	Pro	His	Lys	Ile	Arg	His	Leu	Phe	Thr	Val	Lys	
				260					265					270			

55

60

65

ES 2 320 157 T3

	Ala	Val	Leu	Val	Pro	Phe	Ala	Ser	Phe	Gly	Phe	Leu	Ile	Trp	Ala	Ile	
			275					280					285				
5	Arg	Arg	Ala	His	Gly	Arg	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Leu	Thr	Asp	Val	Gln	
		290					295					300					
	Pro	His	Gly	Ser	Ala	Phe	Ser	Trp	Ala	Phe	Leu	Arg	Ser	Leu	Met	Gly	
10		305				310					315					320	
	Cys	Met	Ala	Asn	Phe	Ser	Thr	Met	Val	Ile	Asn	Ala	Pro	Asp	Phe	Ser	
				325						330					335		
15	Arg	Phe	Ser	Lys	Asn	Pro	Asn	Ser	Ala	Leu	Trp	Ser	Gln	Leu	Val	Cys	
				340					345					350			
	Ile	Pro	Phe	Leu	Phe	Ser	Ile	Thr	Cys	Leu	Ile	Gly	Ile	Leu	Val	Thr	
			355					360					365				
20	Ala	Ala	Gly	Tyr	Glu	Ile	Tyr	Gly	Ile	Asn	Tyr	Trp	Ser	Pro	Leu	Asp	
		370					375					380					
	Val	Leu	Glu	Lys	Phe	Leu	Gln	Thr	Thr	Tyr	Asn	Lys	Gly	Thr	Arg	Ala	
25		385					390				395					400	
	Gly	Val	Phe	Leu	Ile	Ser	Phe	Val	Phe	Ala	Val	Ala	Gln	Leu	Gly	Thr	
				405						410					415		
30	Asn	Ile	Ser	Ala	Asn	Ser	Leu	Ser	Cys	Gly	Thr	Asp	Met	Ser	Ala	Ile	
				420					425					430			
	Phe	Pro	Lys	Phe	Ile	Asn	Ile	Lys	Arg	Gly	Ser	Leu	Phe	Cys	Ala	Ala	
35			435					440						445			
	Met	Ala	Leu	Cys	Ile	Cys	Pro	Trp	Asn	Leu	Met	Ala	Thr	Ser	Ser	Lys	
		450					455					460					
40	Phe	Thr	Met	Ala	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Ile	Phe	Leu	Ser	Ser	Ile	Ala	
		465				470					475					480	
	Gly	Val	Val	Cys	Ser	Asp	Tyr	Phe	Val	Val	Arg	Arg	Gly	Tyr	Ile	Lys	
				485						490					495		
45	Leu	Thr	His	Ile	Tyr	Ser	His	Gln	Lys	Gly	Ser	Phe	Tyr	Met	Tyr	Gly	
				500					505					510			
	Asn	Arg	Phe	Gly	Ile	Asn	Trp	Arg	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	Cys	Gly	
50			515					520						525			
	Val	Ala	Pro	Cys	Leu	Pro	Gly	Phe	Ile	Ala	Glu	Val	Gly	Ala	Pro	Ala	
		530					535					540					
55	Ile	Lys	Val	Ser	Asp	Gly	Ala	Met	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Trp	
		545				550					555					560	
	Val	Gly	Tyr	Gly	Leu	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ala	Leu	Cys	Tyr	Phe	
				565						570					575		
60	Phe	Pro	Val	Pro	Gly	Cys	Pro	Val	Asn	Asn	Ile	Ile	Lys	Asp	Lys	Gly	
				580					585					590			

ES 2 320 157 T3

	Trp Phe Gln Arg Trp Ala Asn Val Asp Asp Phe Glu Glu Glu Trp Lys	
	595 600 605	
5	Asp Thr Ile Glu Arg Asp Asp Leu Val Asp Asp Asn Ile Ser Val Tyr	
	610 615 620	
	Glu His Glu His Glu Lys Thr Phe Ile	
	625 630	
10		
	<210> 3	
	<211> 42	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<400> 3	
20	taacgatctc gagccatggt ggaagaggga aataatgttt ac	42
	<210> 4	
	<211> 38	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<400> 4	
30	ccctaatacac gcgttcctaa cgaccgaagt attttaat	38
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		