



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 744**

51 Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99969648 .7**
96 Fecha de presentación : **01.10.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1115290**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2001**

54 Título: **Sistema retroviral de suministro de genes y métodos de uso.**

30 Prioridad: **01.10.1998 US 102933 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.07.2009

73 Titular/es: **University of Southern California
University Park
3740 McClintock Ave, Suite 131
Los Angeles, California 90089, US**

72 Inventor/es: **Kashahra, Nori;
Logg, Christopher y
Andersen, W. French**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 323 744 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

Sistema retroviral de suministro de genes y métodos de uso.

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional N° de Serie 60/102.933, presentada el 1 de octubre de 1998, para cuya solicitud se realiza una reivindicación de prioridad en relación al 35 U.S.C. § 119(e).

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de forma general al campo de vectores virales y específicamente a un retrovirus con capacidad de replicación recombinante novedoso útil para la transferencia y expresión de secuencias de ácido nucleico en una célula convertida en diana.

15 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de vectores genéticos ha sido el precursor del campo de crecimiento rápido de la transferencia de genes somáticos. (Anderson, W. F., Science, 1984, 226: 401-409). Los vectores basados en retrovirus simples, tales como el Virus de Leucemia de Moloney (MoMLV), se seleccionan a menudo debido a que se integran de forma eficaz en el genoma de la célula diana. Se piensa que la integración es un requisito previo para expresión a largo plazo del gen introducido por transducción. Sin embargo, la transferencia eficaz de genes a tejido tumoral ha sido un impedimento principal para el tratamiento de trastornos proliferativos de células a pesar del uso de vectores virales tales como retrovirus.

En las etapas tempranas de la infección, los retrovirus suministran su centro vírico de nucleoproteína al citoplasma de la célula diana. En este punto tiene lugar la transcripción inversa del genoma viral mientras que el centro vírico madura en un complejo de preintegración. El complejo tiene que alcanzar el núcleo para conseguir la integración del ADN viral en los cromosomas de la célula hospedadora. Para retrovirus simples (oncorretrovirus), esta etapa requiere la disolución de la membrana nuclear en la profase mitótica, muy probablemente debido a que el tamaño voluminoso del complejo de preintegración evita su difusión pasiva a través de los poros nucleares debido a que no existen señales de localización nuclear para facilitar el transporte activo al núcleo.

Actualmente, la mayoría de los vectores retrovirales usados para terapia génica humana no tienen capacidad de replicación y se tienen que producir en "células de empaquetamiento", que contienen secuencias de genoma de virus de tipo silvestre integrados y, por tanto, proporcionan todos los elementos estructurales necesarios para ensamblar virus (es decir, los productos génicos de *gag*, *pol* y *env*) pero no pueden encapsidar sus propios genomas de virus de tipo silvestre debido a una delección de la secuencia señal de empaquetamiento (*psi*). La técnica anterior también describe diversas construcciones retrovirales con capacidad de replicación que se usaron con éxito variable para la introducción y expresión de genes heterólogos (Schmidt y Rethwilm, Virology 210, 167-178 (1995); Terwilliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3857-3861 (1989); Chang *et al.*, J. Virol. 67(3), 743-752 (1993); Murakami *et al.*, Gene 202, 23-29 (1997)). Los vectores de virus sin capacidad de replicación creados por la retirada de los genes estructurales virales y sustitución con genes terapéuticos se introducen en las células de empaquetamiento; siempre que esos vectores contengan la señal *psi*, pueden aprovecharse de las proteínas estructurales proporcionadas por las células y encapsidarse en un virión. Sin embargo, después de la infección de una célula diana, los vectores no tienen capacidad de infecciones horizontales secundarias de células adyacentes debido a la delección de los genes virales esenciales.

El uso de vectores sin capacidad de replicación ha sido una defensa importante contra la propagación incontrolada del virus, ya que se ha demostrado que los retrovirus con capacidad de replicación provocan neoplasias en primates (Donahue *et al.*, J. Exp. Med., 1992, 176: 1124-1135). Sin embargo, los vectores retrovirales sin capacidad de replicación se producen por las células de empaquetamiento con títulos del orden de solamente 10^{6-7} unidades formadoras de colonias (ufc) por ml, que apenas son adecuados para la transducción *in vivo*. De hecho, los experimentos clínicos para terapia génica de glioblastoma multiforme, un tumor cerebral altamente maligno, han tropezado con problemas importantes para conseguir niveles adecuados de transducción de célula tumoral y a pesar de resultados iniciales prometedores en estudios con animales (Culver *et al.*, Science, 1992, 256: 1550-1552). Para aumentar los niveles de transducción tanto como sea posible, en vez del uso de una única dosis de sobrenadante que contiene virus, se inyectó la propia línea celular PA317 de empaquetamiento de virus en los tumores cerebrales para producir de forma constitutiva vectores de retrovirus que portan el gen HSV-tk (Oldfield *et al.*, Human Gene Therapy, 1993, 4: 39-69). Posteriormente, el protocolo se modificó adicionalmente para incluir un procedimiento de desvoluminización seguido de múltiples sitios de inyección, ya que se observó que los vectores de virus no difunden lo suficiente desde el sitio de la inyección inicial. A pesar de estas modificaciones, se ha estimado que la eficacia de transducción es inferior al 1% de la masa de células tumorales y se supone que cualquier destrucción significativa de tumor se debe al efecto "espectador" potente del tratamiento con HSV-tk/ganciclovir. Por tanto, la transducción eficaz de células cancerosas en una masa de tumor sólido representa un problema importante para la terapia génica de cáncer.

En consecuencia, existe una necesidad de un vector de transferencia de genes con capacidad de un alto nivel de transducción *in vivo*, aunque limitando la propagación incontrolada de virus con capacidad de replicación, lo que podría dar como resultado mutagénesis insercional y carcinogénesis.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona vectores retrovirales con capacidad de replicación recombinantes para suministro de genes. Los vectores proporcionan un alto nivel de transducción *in vivo*. El uso de vectores con capacidad de replicación de la invención permite la transducción *in vivo* eficaz. La incorporación de secuencias polinucleotídicas dirigidas a tipo celular en tales vectores reduce o elimina el potencial patógeno nativo de retrovirus con capacidad de replicación mientras que mejora su especificidad de célula diana.

En una realización, la presente invención proporciona un oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante que tiene un ácido nucleico que codifica una proteína GAG retroviral; un ácido nucleico que codifica una proteína POL retroviral; un ácido nucleico que codifica una envuelta retroviral; una secuencia polinucleotídica retroviral que comprende secuencias de Repetición Terminal Larga (LTR) en los extremos 5' y 3' del genoma retroviral, donde una secuencia de promotor específico de tejido está contenida dentro de las secuencias LTR en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, siendo dicho promotor un promotor de mamífero, un casete que comprende un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) unido operativamente a un gen heterólogo donde el casete se coloca justo cadena abajo de la secuencia que codifica la envuelta retroviral pero cadena arriba de la LTR 3'; y secuencias de ácido nucleico que actúan *in cis* necesarias para la transcripción inversa, el empaquetamiento y la integración en una célula diana, donde la secuencia polinucleotídica retroviral se obtiene de virus de leucemia murina (MLV), virus de leucemia murina de moloney (MoMLV) o virus de leucemia de gibón (GaLV). El promotor puede estar asociado con un gen regulador del crecimiento, tal como, por ejemplo, probasina. Para dirigir el retrovirus a una célula o tejido específico, la envuelta retroviral puede comprender una proteína quimérica que comprende proteína ENV y una secuencia de ligando específico de diana que codifica, por ejemplo, un anticuerpo, receptor o ligando tal como heregulina.

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido oncorretroviral con capacidad de replicación recombinante, que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína GAG retroviral; una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína POL retroviral; una secuencia de ácido nucleico que codifica una envuelta retroviral; una secuencia polinucleotídica retroviral que comprende una Repetición Terminal Larga (LTR) en el extremo 5' y 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, donde una secuencia de promotor específico de tejido está contenida dentro de la LTR en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral; siendo dicho promotor un promotor de mamífero, un casete que comprende un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) unido operativamente a un gen heterólogo, donde el casete se coloca justo cadena abajo de la secuencia que codifica la envuelta retroviral pero cadena arriba de la LTR 3'; y una secuencia polinucleotídica que actúa *in cis* necesaria para la transcripción inversa, el empaquetamiento y la integración en una célula diana. La secuencia de promotor específico de tejido es, por ejemplo, una asociada con un gen regulador del crecimiento o una asociada con un marcador de cáncer (por ejemplo, probasina). La envuelta retroviral puede comprender una proteína quimérica que comprende proteína ENV con una secuencia polinucleotídica de ligando específico de diana, por ejemplo, una secuencia que codifica un anticuerpo, un receptor (por ejemplo, un receptor de hormona) o un ligando, tal como, por ejemplo, heregulina.

Éstos y otros aspectos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de las enseñanzas de este documento.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 (A) es una ilustración esquemática de la estructura de retrovirus MoMLV (con capacidad de replicación) de tipo silvestre; LTR = repetición terminal larga. (B) es una representación esquemática de g1ZD-GFP y g1ZD-higro, que muestra los tamaños de los casetes de transgén-IRES y el sitio de su inserción en el genoma de MLV de tipo silvestre. Las flechas indican la ubicación de los sitios *NheI* usados para digerir ADN para análisis de hibridación de Southern y las líneas onduladas indican regiones de los vectores sondadas en análisis de hibridación. También se muestran las secuencias de g1ZD-GFP y g1ZD-higro en ubicaciones entre el gen *env* e IRES, IRES y GFP y GFP y LTR 3'. Las letras en negrita indican codones de inicio o terminación presentes dentro de las uniones.

La Figura 2 es una ilustración esquemática de la estructura de los vectores basados en MoMLV modificados de la presente invención. A) Un diagrama esquemático de la estructura de vectores retrovirales con capacidad de replicación (RCR) basados en MoMLV que contienen un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES). B) Un diagrama esquemático de vectores retrovirales con capacidad de replicación (RCRV) dirigidos.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra un ensayo de transcriptasa inversa de vectores RCR basados en MoMLV propagados por células NIH3T3 en cultivo. Simulado = control negativo no infectado; gIZAP = virus MoMLV con capacidad de replicación de tipo silvestre; g1ZD-gfp = virus MoMLV con capacidad de replicación con sitio interno de entrada de ribosoma IRES en el extremo 3' del gen de envuelta y transgén de proteína verde fluorescente (GFP); g1ZD-puro = virus MoMLV con capacidad de replicación con IRES en el extremo 3' de gen de envuelta y transgén de resistencia a puromicina (PURO[®]); g1ZD-higro = virus MoMLV con capacidad de replicación con IRES en el extremo 3' del gen de envuelta y transgén de resistencia a higromicina (HIGRO[®]). (B) muestra una comparación de Cinéticas de Replicación de Vectores con Capacidad de Replicación y MoMLV de Tipo silvestre en Células Cultivadas.

ES 2 323 744 T3

La Figura 4 son gráficos que muestran análisis de separador de células activadas por fluorescencia (FACS) de expresión de GFP de vector RCR gIZD-gfp propagado en diversos puntos de tiempo (Día 2, Día 4 y Día 7) después de infección inicial.

5 La Figura 5 es un gráfico que ilustra la estabilidad de la expresión del transgén de GFP del vector gIZD-GFP con capacidad de replicación a lo largo de múltiples pases seriados.

10 La Figura 6 es una fotografía de gel que muestra la estabilidad del vector gIZD-GFP con capacidad de replicación a lo largo de múltiples pases seriados. El carril P es una muestra de control que contiene ADN plasmídico de gIZD-GFP (A) o gIZD-higro (B) digerido con *NheI*. Los demás números de carril indican el número de pase seriado. (A) ADN de células infectadas con gIZD-GFP sondado con el ADNc de GFP (izquierda) y con el fragmento LTR-gag (derecha). (B) ADN de células infectadas con gIZD-higro sondado con el gen de resistencia a higromicina (izquierda) y con el fragmento LTR-gag (derecha). Se observa gIZD-GFP de longitud completa intacto hasta al menos el pase N° 11 (A, B). Un mutante de delección más corto aparece en los pases N° 7-8 que después se convierte en la forma dominante. N indica carriles que contienen ADN Hirt aislado de células NIH3T3 no infectadas.

20 La Figura 7 es un esquema que muestra el experimento y los resultados que demuestran la propagación intratumoral altamente eficaz del vector gIZD-GFP con capacidad de replicación con un modelo de cáncer de mama establecido por vía subcutánea.

La Figura 8 es un esquema de un vector retroviral recombinante de la invención que contiene una secuencia de promotor de probasina.

25 La Figura 9 muestra la construcción de un retrovirus con capacidad de replicación recombinante de la invención dirigido a células de cáncer de próstata.

La Figura 10 ilustra una estrategia usada para determinar la especificidad de células de próstata y capacidad de inducción por andrógenos del promotor híbrido de probasina-LTR.

30 La Figura 11 muestra los resultados del ensayo ilustrado en la figura 10.

La Figura 12 ilustra una estrategia usada para examinar la regulación de la transcripción de vectores RCR dirigidos por el promotor híbrido de probasina-LTR.

35 La Figura 13 muestra los resultados de la expresión que responde a andrógenos dirigida por probasina-LTR del transgén de GFP del vector RCR después de la infección de células TRAMP-C.

La Figura 14 muestra la estructura de vectores RCR con secuencias IRES más cortas.

40 La Figura 15 muestra una comparación de los niveles de expresión de GFP en células infectadas con vectores que utilizan tres secuencias IRES diferentes.

45 La Figura 16 es un análisis de Transferencia de Southern de ADN proviral no integrado de células cultivadas infectadas de forma seriada con ZB-GFP (A) o ZV-GFP (B). Las sondas usadas eran para la región LTR-gag de Mo-MLV.

50 La Figura 17 es un esquema de vectores RCR dirigidos a dominio Z. Ambos vectores contienen 2 copias en tándem del dominio Z de proteína A con la PRR del gen de envuelta. En ZE-GFP, la traducción de GFP se dirige por el IRES de EMCV y en ZV-A-GFP, por el IRES de VEGF.

55 La Figura 18 es un esquema que muestra la estructura de envuelta de vectores RCR que contienen scFv anti-HER2. ss: secuencia señal; SU: proteína de superficie; RBD: dominio de unión a receptor; PRR: región rica en prolina; C-SU: extremo C de SU; TM: proteína transmembrana; espaciador: un espaciador sintético de 6 aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

Para facilitar la comprensión de la invención a continuación se definen varios términos.

60 “Polinucleótido” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 9 bases de longitud. Con “secuencia de ácido nucleico aislado” se quiere decir un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a ninguna de las secuencias codificantes a la que es inmediatamente contigua (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que se obtiene. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN o ARN recombinante que se incorpora en un vector viral. Los nucleótidos de la invención pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquier nucleótido. La expresión incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN. El término polinucleótido o polinucleótidos se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por tanto, por ejemplo, los polinucleótidos como se usan en este documento se refieren, entre

otras cosas, a ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias.

5 Además, el polinucleótido como se usa en este documento también se puede referir a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero más típicamente implican solamente una región de algunas de las moléculas. Con frecuencia, una de las moléculas de una región de triple hélice es un oligonucleótido.

10 Como se usa en este documento, el término polinucleótido incluye ADN o ARN como se han descrito anteriormente que contienen uno o más bases modificadas. Por tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otros motivos son "polinucleótidos" como ese término se usa en este documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases no habituales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solamente dos ejemplos, son polinucleótidos como se usa el término en este documento.

15 Se entenderá que se tiene que realizar una gran diversidad de modificaciones en ADN y ARN que sirven para muchos propósitos útiles conocidos por los especialistas en la técnica. El término polinucleótido como se emplea en este documento incluye tales formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, que incluyen células simples y complejas, entre otras cosas.

20 La presente invención proporciona un oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante capaz de infectar células convertidas en diana. El virus es útil para la transferencia *in vivo* y *ex vivo* y expresión de genes y secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, en células en división). En particular, los presentes vectores oncorretrovirales son útiles para dirigirse a tipos celulares específicos que incluyen, pero sin limitación, células neoplásicas o células que tienen trastornos proliferativos de células.

30 La presente invención tiene muchas utilidades. Por ejemplo, el oncorretrovirus de la presente invención se puede usar para proporcionar un producto terapéutico a un sujeto, para proporcionar suministro de genes de una proteína no terapéutica o una proteína terapéutica a un sujeto, así como en estudios *in vitro* para proporcionar a una célula un gen para expresión de un producto génico. Tales métodos *in vitro* son útiles, por ejemplo, en producción de proteína y el estudio de regulación e interacción de productos que actúan en *cis* y polipéptidos.

35 *Retrovirus*

Los retrovirus son virus ARN en los que el genoma viral es ARN. Cuando una célula hospedadora se infecta con un retrovirus, el ARN genómico se transcribe de forma inversa en un intermedio de ADN que se integra de forma muy eficaz en el ADN cromosómico de células infectadas. El intermedio de ADN integrado se denomina un provirus. La familia *Retroviridae* son virus ARN monocatenarios envueltos que infectan típicamente mamíferos, tales como, por ejemplo, bovinos, monos, ovejas y seres humanos, así como especies aviares. Los retrovirus son únicos entre los virus ARN por que su multiplicación implica la síntesis de una copia de ADN del ARN que se integra después en el genoma de la célula infectada.

45 La familia *Retroviridae* consiste en tres grupos: los espumavirus (o virus espumosos) tales como los virus espumosos humanos (HFV); los lentivirus, así como un virus visna de oveja; y los oncovirus (aunque no todos los virus dentro de este grupo son oncogénicos). El término "lentivirus" se usa en su sentido convencional para describir un género de virus que contienen transcriptasa inversa. Los lentivirus incluyen los "virus de inmunodeficiencia" que incluyen virus de inmunodeficiencia humana (VIH) de tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) y virus de inmunodeficiencia de simio (VIS). Los oncovirus se subdividen adicionalmente en grupos A, B, C y D basándose en la morfología de partículas, como se observa bajo el microscopio electrónico durante la maduración viral. Las partículas de tipo A representan las partículas inmaduras de los virus de tipo B y D observadas en el citoplasma de células infectadas. Estas partículas no son infecciosas. Las partículas de tipo B realizan gemación como virión maduro desde la membrana plasmática por la envuelta de partículas de tipo A intracitoplasmáticas. En la membrana poseen un centro vírico toroidal de ~75 nm, del que sobresalen espículas de glucoproteína largas. Después de la gemación, las partículas de tipo B contienen un centro vírico electrodenso localizado excéntricamente. El prototipo del virus de tipo B es el virus de tumor mamario de ratón (MMTV). No se pueden observar partículas intracitoplasmáticas en células infectadas por virus de tipo C. En su lugar, las partículas maduras realizan gemación directamente desde la superficie celular por una condensación con forma de "C" a modo de semicírculo que después se cierra sobre sí misma y queda rodeada por la membrana plasmática. Las espículas de glucoproteína de envuelta pueden ser visibles, junto con un centro vírico uniformemente electrodenso. La gemación puede tener lugar desde la membrana plasmática superficial o directamente en vacuolas intracelulares. Los virus de tipo C son los estudiados más comúnmente e incluyen muchos de los virus de leucemia aviar y murina (MLV). El virus de leucemia bovina (BLV) y los virus de leucemia de células T humanos de los tipos I y II (HTLV-I/II) se clasifican de forma similar a las partículas de tipo C debido a la morfología de su gemación desde la superficie celular. Sin embargo, también tienen una morfología hexagonal regular y estructuras genómicas más complejas que los virus de tipo C prototípicos tales como los virus de leucemia murina (MLV). Las partículas de tipo D se parecen a las partículas de tipo B porque muestran estructuras a modo de anillo en el citoplasma de la célula infectada, que

ES 2 323 744 T3

realizan gemación desde la superficie celular, pero el virión incorpora espículas de glucoproteína superficial cortas. Los centros víricos electrodenso también se ubican excéntricamente dentro de las partículas. El virus de mono Mason Pfizer (MPVM) es el prototipo de virus de tipo D.

5 Los retrovirus se definen por el modo en el que replican su material genético. Durante la replicación, el ARN se convierte en ADN. Después de la infección de la célula se genera una molécula bicatenaria de ADN a partir de las dos moléculas de ARN que se llevan en la partícula viral por el proceso molecular conocido como transcripción inversa. La forma de ADN se integra covalentemente en el genoma de la célula hospedadora como un provirus, del que se expresan ARN virales con la ayuda de factores celulares y/o virales. Los ARN virales expresados se empaquetan en partículas y se liberan como virión infeccioso.

10 La partícula de retrovirus está compuesta por dos moléculas idénticas de ARN. Cada genoma de tipo silvestre tiene una molécula de ARN monocatenaria de sentido positivo, que tiene una caperuza en el extremo 5' y está poliadenilada en la cola 3'. La partícula de virus diploide contiene las dos cadenas de ARN que forman complejos con proteínas gag, enzimas virales (productos génicos de pol) y moléculas de ARNt hospedador dentro de una estructura de "centro vírico" de proteínas gag. Rodeando y protegiendo esta cápsida hay una bicapa lipídica, obtenida de membranas de la célula hospedadora y que contiene proteínas de envuelta (env) virales. Las proteínas env se unen a un receptor celular para el virus y la partícula entra típicamente en la célula hospedadora por endocitosis mediada por receptor y/o fusión de membranas.

20 Después de despojarse de la envuelta externa, el ARN viral se copia en ADN por transcripción inversa. Esto se cataliza por la enzima transcriptasa inversa codificada por la región pol y usa el ARNt de la célula hospedadora empaquetado en el virión como un cebador para la síntesis de ADN. De este modo, el genoma de ARN se convierte en el genoma de ADN más complejo.

25 El ADN lineal bicatenario producido por transcripción inversa se tiene, o no se tiene, que circularizar en el núcleo. Ahora, el provirus tiene dos repeticiones idénticas en cada extremo, conocidas como las repeticiones terminales largas (LTR). Los extremos de las dos secuencias de LTR producen el sitio reconocido por un producto de pol -la proteína integrasa- que cataliza la integración, de tal forma que el provirus siempre está unido al ADN hospedador a dos pares de bases (pb) de los extremos de las LTR. Se observa una duplicación de secuencias celulares en los extremos de ambas LTR, una reminiscencia del patrón de integración de elementos genéticos de transposición. Se piensa que la integración tiene lugar esencialmente de forma aleatoria dentro del genoma de la célula diana. Sin embargo, mediante modificación de las repeticiones terminales largas es posible controlar la integración de un genoma retroviral.

30 La transcripción, el corte y empalme de ARN y la traducción del ADN viral integrado están mediados por proteínas de la célula hospedadora. Se generan transcritos de corte y empalme diverso. En el caso de los retrovirus humanos VIH-1/2 y HTLV-1/2, las proteínas virales también se usan para regular la expresión génica. La interacción entre factores celulares y virales es importante para el control de la latencia del virus y la secuencia temporal en la que se expresan los genes virales.

40 Los retrovirus se pueden transmitir horizontalmente y verticalmente. La transmisión infecciosa eficaz de retrovirus requiere la expresión en la célula diana de receptores que reconocen específicamente las proteínas de envuelta viral, aunque los virus pueden usar vías de entrada no específicas independientes de receptor con baja eficacia. Además, el tipo de célula diana tiene que ser capaz de soportar todas las etapas del ciclo de replicación después de que se haya unido y penetrado el virus. La transmisión vertical tiene lugar cuando el genoma viral se integra en la línea germinal del hospedador. Después, el provirus se pasará de generación a generación como si fuera un gen celular. Por lo tanto, se establecen provirus endógenos que frecuentemente existen de forma latente, pero que se pueden activar cuando el hospedador se expone a agentes apropiados.

50 *Retrovirus Recombinantes con Capacidad de Replicación*

Como se ha mencionado anteriormente, el intermedio de ADN integrado se denomina un provirus. La terapia génica o los sistemas de suministro de genes anteriores usan métodos y retrovirus que requieren la transcripción del provirus y el ensamblaje en virus infeccioso mientras que está en presencia de un virus auxiliar apropiado o en una línea celular que contiene secuencias apropiadas que permiten la encapsidación sin producción coincidente de un virus auxiliar contaminante. Como se describe más adelante, no se requiere un virus auxiliar para la producción del oncorretrovirus recombinante de la presente invención, ya que las secuencias para encapsidación se proporcionan en el genoma, proporcionando de este modo un vector oncorretroviral con capacidad de replicación para suministro o terapia génica.

60 El genoma oncorretroviral y el ADN proviral de la presente invención tienen al menos tres genes: el *gag*, el *pol* y el *env*, que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) que contienen secuencias que actúan en *cis* tales como *psi*. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales internas (matriz, cápsida y nucleocápsida); el gen *pol* codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), proteasa e integrasa; y el gen *env* codifica glucoproteínas de envuelta viral. Las LTR 5' y 3' sirven para promover la transcripción y poliadenilación de los ARN de virión. Las LTR contienen todas las demás secuencias que actúan en *cis* necesarias para la replicación viral.

ES 2 323 744 T3

De forma adyacente a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión a cebador de ARNt) y para encapsidación eficaz de ARN viral en partículas (el sitio Psi). Si las secuencias necesarias para la encapsidación (o el empaquetamiento de ARN retroviral en virión infeccioso) están ausentes en el genoma viral, el resultado es un defecto *cis* que evita la encapsidación de ARN viral genómico. Este tipo de vector modificado es el que se ha usado típicamente en sistemas de suministro de genes anteriores (es decir, sistemas que carecen de elementos que se requieren para la encapsidación del virión).

En una primera realización, la invención proporciona un oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante capaz de infectar una célula en división o una célula que tiene un trastorno proliferativo de células. El oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante de la presente invención comprende una secuencia polinucleotídica que tiene un GAG viral, un POL viral, un ENV viral, un polinucleótido heterólogo y una o más secuencias polinucleotídicas dirigidas para la dirección específica de célula o tejido del retrovirus a un tejido, célula o tipo celular particular, como se describe en este documento.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga se une operativamente a un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES). Como se usa en este documento, el término secuencia de ácido nucleico "heteróloga" o "transgén" se refiere a una secuencia que no existe normalmente en la naturaleza (por ejemplo, en el retrovirus de tipo silvestre) o una secuencia que se origina a partir de una especie extraña o, si es de la misma especie, puede estar sustancialmente modificada desde su forma original. Alternativamente, una secuencia de ácido nucleico no modificada que no se expresa normalmente en una célula es una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

Dependiendo del uso pretendido del vector oncorretroviral de la presente invención se puede insertar cualquier número de secuencias polinucleotídicas o de ácido nucleico heterólogas en el vector oncorretroviral. Por ejemplo, para estudios *in vitro* usados comúnmente, se pueden usar genes marcadores o genes indicadores, que incluyen resistencia a antibióticos y moléculas fluorescentes (por ejemplo, GFP). También se pueden insertar secuencias polinucleotídicas adicionales que codifican cualquier secuencia polipeptídica deseada en el vector de la presente invención. Cuando se busca el suministro *in vivo* de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, se pueden usar secuencias tanto terapéuticas como no terapéuticas. Por ejemplo, la secuencia heteróloga puede codificar una molécula terapéutica que incluye moléculas antisentido o ribozimas dirigidas a un gen particular asociado con un trastorno proliferativo de células, la secuencia heteróloga puede ser un gen suicida (por ejemplo, HSV-tk o PNP) o una proteína terapéutica (por ejemplo, Factor IX). Otras proteínas terapéuticas aplicables a la presente invención se identifican de forma sencilla en la técnica (véase, por ejemplo, R. Crystal, Science 270: 404-410 (1995)).

Por tanto, el oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante de la invención es capaz de transferir una secuencia de ácido nucleico a una célula diana.

La expresión secuencia de ácido nucleico se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico, que incluye ADN, ARN o secuencias de ácido nucleico modificadas. La molécula de ácido nucleico se puede obtener de una diversidad de fuentes, que incluyen ADN, ADNc, ADN sintético, ARN o combinaciones de los mismos. Tales secuencias de ácido nucleico pueden comprender ADN genómico que puede incluir o no intrones de origen natural. Además, tal ADN genómico se puede obtener en asociación con regiones de promotor, intrones o secuencias poli A. Se puede extraer el ADN genómico y purificar a partir de células adecuadas mediante medios bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el ARN mensajero (ARNm) se puede aislar de células y usar para producir ADNc mediante transcripción inversa u otros medios. El especialista en la técnica puede identificar un IRES que es aplicable para el uso pretendido, por ejemplo, *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

La expresión "región de promotor" se usa en este documento en su sentido normal para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, donde la secuencia reguladora se obtiene de un gen que es capaz de unirse a ARN polimerasa e iniciar transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección 3'). La secuencia reguladora puede ser homóloga o heteróloga a la secuencia génica deseada. Por ejemplo, se puede utilizar una amplia variedad de promotores, que incluyen promotor viral o de mamífero.

La expresión "unido operativamente" se refiere a una unión funcional entre el IRES y la secuencia de ácido nucleico heteróloga. La secuencia heteróloga puede estar unida a un promotor, dando como resultado un gen quimérico. La secuencia de ácido nucleico heteróloga preferiblemente está bajo el control de señales de promotor-potenciador de LTR viral o de un promotor interno y las señales retenidas dentro de la LTR retroviral todavía pueden provocar la integración eficaz del vector en el genoma de la célula hospedadora.

Un ejemplo de secuencia polinucleotídica que puede estar unida operativamente al IRES incluye proteína verde fluorescente (GFP) o un gen marcador de selección. Los genes marcadores se utilizan para ensayar la presencia del vector y, por tanto, para confirmar la infección e integración. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras sustancias tóxicas como, por ejemplo, histidinol, puromicina, higromicina, neomicina, metotrexato y otros genes indicadores conocidos en la técnica. Otra secuencia polinucleotídica que puede estar unida al IRES incluye, por ejemplo, genes suicidas, tales como PNP y HSV-timidina quinasa (Figura 2), secuencias polinucleotídicas que codifican una molécula antisentido o secuencias polinucleotídicas que codifican un ribosoma.

Puede ser ventajoso tener en una disposición vectores de terapia génica más eficaces capaces, en particular, de producir varias proteínas de interés de forma eficaz. Sin embargo, la presencia de varios promotores dentro del mismo vector se manifiesta frecuentemente por sí misma en una reducción o incluso una pérdida de expresión a lo largo del tiempo. Esto se debe a un fenómeno bien conocido de interferencia entre secuencias de promotor. En este contexto, la publicación de la Solicitud Internacional WO93/03143 propone una solución para este problema que consiste en emplear un IRES. Describe un vector retroviral dicistrónico para la expresión de dos genes de interés puestos bajo el control del mismo promotor. Por ejemplo, la presencia de un sitio IRES de picornavirus entre estos genes permite la producción del producto de expresión que se origina del segundo gen de interés por inicio interno de la traducción del ARNm dicistrónico (véase Morgan *et al.*, Nucleic Acids Research, 20: (6) 1293-1299 (1992)).

Normalmente, la entrada de ribosomas en ARN mensajero tiene lugar por el capuchón ubicado en el extremo 5' de todos los ARNm eucariotas. Sin embargo, existen excepciones a esta regla universal. La ausencia de un capuchón en algunos ARNm virales sugiere la existencia de estructuras alternativas que permiten la entrada de ribosomas en un sitio interno de estos ARN. Hasta la fecha se han identificado varias de estas estructuras, denominadas IRES debido a su función, en la región no codificante 5' de ARNm virales sin capuchón, tales como las de, en particular, picornavirus tales como el virus de poliomielitis (Pelletier *et al.*, 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103-1112) y el virus EMCV (virus de encefalomiocarditis (Jang *et al.*, 1988, 62, 2636-2643)). La presente invención proporciona el uso de un IRES en el contexto de un vector oncorretroviral con capacidad de replicación.

En otra realización se incluye una secuencia polinucleotídica de dirección como parte del vector retroviral recombinante de la presente invención. La secuencia polinucleotídica de dirección es un ligando de dirección (por ejemplo, hormonas peptídicas tales como heregulina, anticuerpos de cadena única, un receptor o un ligando para un receptor), un elemento regulador específico de tejido o específico de tipo celular (por ejemplo, un promotor o potenciador específico de tejido o específico de tipo celular) o una combinación de un ligando de dirección y un elemento regulador específico de tejido/específico de tipo celular.

El ligando de dirección está unido operativamente a la proteína env del retrovirus, creando una proteína env retroviral quimérica. Las proteínas GAG viral, POL viral y ENV viral se pueden obtener de cualquier retrovirus adecuado (por ejemplo, obtenidos de MLV o de lentivirus). En otra realización, la proteína ENV viral no se obtiene de retrovirus (por ejemplo, CMV o VSV).

El oncorretrovirus recombinante de la invención, por lo tanto, está modificado genéticamente de tal modo que el virus se dirige a un tipo celular particular (por ejemplo, células de músculo liso, células hepáticas, células renales, fibroblastos, queratinocitos, células madre mesenquimales, células de médula ósea, condrocitos, células epiteliales, células intestinales, células neoplásicas y otras conocidas en la técnica) de tal forma que el genoma de ácido nucleico se suministra a una célula diana en división, que incluye una célula diana que tiene un trastorno proliferativo de células. La dirección se puede conseguir de dos modos. El primer modo dirige el retrovirus a una célula diana uniéndose preferentemente a células que tienen una molécula sobre la superficie externa de la célula. Este método de dirigir el retrovirus utiliza la expresión de un ligando de dirección sobre la cubierta del retrovirus para ayudar a la dirección del virus a células o tejidos que tienen un receptor o molécula de unión que interacciona con el ligando de dirección sobre la superficie del retrovirus. Después de la infección de una célula por el virus, el virus inyecta su ácido nucleico en la célula y el material genético del retrovirus puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora. El segundo método para dirección usa elementos reguladores específicos de células o tejidos para promover preferentemente la expresión y la transcripción del genoma viral en una célula dirigida que utiliza activamente los elementos reguladores, como se describe con más detalle más adelante. El material genético de retrovirus transferido después se transcribe y produce en proteínas dentro de la célula hospedadora. El elemento regulador de dirección está unido preferiblemente a la LTR 5' y/o 3', creando una LTR quimérica.

Insertando una secuencia de interés de ácido nucleico heteróloga en el vector viral de la invención, junto con otro gen que codifica, por ejemplo, el ligando para un receptor en una célula diana específica, el vector ahora es específico de diana. Los vectores virales se pueden convertir en específicos de diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido o una proteína. La dirección se puede conseguir mediante el uso de un anticuerpo para dirigir el vector viral. Los especialistas en la técnica conocerán, o podrán determinar fácilmente, secuencias polinucleotídicas específicas que se pueden insertar en el genoma viral o proteínas que se pueden unir a una envuelta viral para permitir el suministro específico de diana del vector viral que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés.

Por tanto, la presente invención incluye en una realización una proteína env quimérica que comprende una proteína env retroviral unida operativamente a un polipéptido de dirección. El polipéptido de dirección puede ser una molécula receptora específica de célula, un ligando para un receptor específico de célula, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para un epítipo antigénico específico de célula o cualquier otro ligando identificado de forma sencilla en la técnica que sea capaz de unirse o interaccionar con una célula diana. Los ejemplos de polipéptidos o moléculas de dirección incluyen anticuerpos bivalentes que usan biotina-estreptavidina como enlazadores (Etienne-Julan *et al.*, J. Of General Virology, 73, 3251-3255 (1992); Roux *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, 9079-9083 (1989)), virus recombinante que contiene en su envuelta una secuencia que codifica una región variable de anticuerpo de cadena única frente a un hapteno (Russell *et al.*, Nucleic Acids Research, 21, 1081-1085 (1993)), clonación de ligandos de hormona peptídica en la envuelta del retrovirus (Kasahara *et al.*, Science, 266, 1373-1376 (1994)), construcciones EPO/env quiméricas (Kasahara *et al.*, 1994), anticuerpo de cadena única frente al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDL) en la envuelta de MLV ecotrópica, dando como resultado infección específica de células HeLa que expresan receptor LDL

(Somia *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92, 7570-7574 (1995)), de forma similar, el espectro de hospedador de ALV se puede alterar por incorporación de un ligando de integrina, permitiendo que el virus cruce especies para infectar específicamente células de glioblastoma de rata (Valesia-Wittmann *et al.*, J. Virol. 68, 4609-4619 (1994)) y Dornberg y colaboradores (Chu y Dornburg, J. Virol 60, 2659-2663 (1995)) han descrito la dirección específica de tejido de virus de necrosis esplénica (SNV), un retrovirus aviar, que usa envueltas que contienen anticuerpos de cadena única dirigidos contra marcadores tumorales.

Un método para producir un oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante capaz de infectar una célula diana comprende transfectar una célula hospedadora adecuada con lo siguiente: un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un *gag* viral, un *pol* viral y un *env* viral, donde el vector contiene un sitio de clonación para la introducción de un gen heterólogo, unido operativamente a un IRES como se especifica en las reivindicaciones y recuperar el virus recombinante. Una ilustración de los vectores individuales usados se muestra en las Figuras 1 y 2.

El retrovirus de la invención proporciona un oncorretrovirus con capacidad de replicación que no requiere virus auxiliar o secuencia de ácido nucleico adicional o proteínas para propagarse y producir viriones. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico del oncorretrovirus de la presente invención codifican, por ejemplo, un antígeno específico de grupo y transcriptasa inversa (y enzimas integrasa y proteasa necesarias para la maduración y transcripción inversa), respectivamente, como se ha discutido anteriormente. Además, el genoma de ácido nucleico del retrovirus de la presente invención incluye una secuencia que codifica una proteína de envuelta viral (ENV). El gen *env* se puede obtener de cualquier retrovirus. El *env* puede ser una proteína de envuelta anfotrópica que permite la transducción de células de especie humana u otras o puede ser una proteína de envuelta ecotrópica que es capaz de transducir solamente células de ratón y de rata. Adicionalmente, puede ser deseable dirigir el virus recombinante por unión de la proteína de envuelta con un anticuerpo o un ligando particular para la dirección a un receptor de un tipo celular particular. Como se ha mencionado anteriormente, los vectores retrovirales se pueden convertir en específicos de diana insertando, por ejemplo, un glucolípido o una proteína. La dirección se consigue frecuentemente mediante el uso de un anticuerpo para dirigir el vector retroviral a un antígeno o un tipo celular particular (por ejemplo, un tipo celular observado en un cierto tejido o un tipo de célula cancerosa). Los especialistas en la técnica conocerán, o pueden determinar fácilmente sin experimentación innecesaria, métodos específicos para conseguir el suministro de un vector retroviral a una diana específica. Los ejemplos de genes *env* obtenidos de retrovirus, incluyen, pero sin limitación: virus de leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus de sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de leucemia de gibón (GaLV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y Virus de Sarcoma de Rous (RSV).

A diferencia de retrovirus recombinantes producidos por métodos convencionales en la técnica que son defectuosos y requiere ayuda para producir partículas de vector infecciosas, la presente invención proporciona un retrovirus que tiene capacidad de replicación.

En otra realización, la presente invención proporciona vectores retrovirales que se dirigen usando secuencias reguladoras. Se pueden usar secuencias reguladoras específicas de células o tejidos (por ejemplo, promotores) para dirigir la expresión de secuencias génicas en poblaciones de células específicas. En la técnica están disponibles promotores de mamífero y virales adecuados para la presente invención. En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona un oncorretrovirus que tiene elementos de promotor específicos de tejido en los extremos 5' y 3' del genoma retroviral. Preferiblemente, los elementos/secuencias reguladores específicos de tejido están en la región U3 de la LTR del genoma retroviral, que incluyen, por ejemplo, promotores y potenciadores específicos de células o tejidos para células neoplásicas (por ejemplo, potenciadores y promotores específicos de célula tumoral) y promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclina). Las secuencias de control de la transcripción de la presente invención también pueden incluir secuencias de control de la transcripción de origen natural asociadas de forma natural con un gen que codifica un superantígeno, una citoquina o una quimioquina de la presente invención.

Los "elementos reguladores específicos de tejido" son elementos reguladores (por ejemplo, promotores) que son capaces de dirigir la transcripción de un gen en un tejido mientras que permanecen en gran medida "silenciosos" en otros tipos tisulares. Sin embargo, se entenderá que los promotores específicos de tejido pueden tener una cantidad detectable de actividad de "fondo" o "base" en esos tejidos cuando son silenciosos. El grado hasta el que se activa selectivamente un promotor en un tejido diana se puede expresar como una proporción de selectividad (actividad en un tejido diana/actividad en un tejido de control). A este respecto, un promotor específico de tejido útil en la práctica de la presente invención tiene típicamente una proporción de selectividad mayor de 5. Preferiblemente, la proporción de selectividad es mayor de aproximadamente 15.

Se entenderá adicionalmente que ciertos promotores, aunque no restringidos en actividad a un único tipo tisular, pueden, sin embargo, mostrar selectividad porque pueden ser activos en un grupo de tejidos y menos activos o silenciosos en otro grupo. Tales promotores también se denominan "específicos de tejido" y se consideran para el uso con la presente invención. Por ejemplo, los promotores que son activos en una diversidad de neuronas del sistema nervioso central (SNC) pueden ser útiles terapéuticamente para proteger contra lesión debido a apoplejía, que puede afectar a cualquiera de varias regiones diferentes del cerebro. En consecuencia, los elementos reguladores específicos de tejidos usados en la presente invención tienen aplicabilidad para la regulación de las proteínas heterólogas, así como aplicabilidad como una secuencia polinucleotídica de dirección en los presentes vectores retrovirales.

Los promotores específicos de tejidos se pueden obtener, por ejemplo, de regiones de promotor de genes que se expresan de forma diferencial en diferentes tejidos. Por ejemplo, se ha identificado una diversidad de promotores que son adecuados para regular positivamente la expresión en tejido cardíaco. Se incluyen, por ejemplo, el promotor de cadena pesada de α -miosina cardíaca (AMHC) y el promotor de α -actina cardíaca. Otros ejemplos de elementos reguladores específicos de tejido incluyen promotores específicos de tejido tales como promotor de actina específico de leche (suero), pancreático (insulina o elastasa) en células de músculo liso o promotores neuronales (proteína básica de mielina). Mediante el uso de promotores, tales como promotores específicos de leche, los retrovirus recombinantes se pueden aislar directamente del fluido biológico de la progenie.

Adicionalmente, numerosos métodos de terapia génica, que se aprovechan de vectores retrovirales para tratar una amplia diversidad de enfermedades, se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.405.712 y 4.650.764; Friedmann, 1989, Science, 244: 1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260: 926-932, R. Crystal, 1995, Science 270: 404-410). Un número creciente de estos métodos se está aplicando actualmente en experimentos clínicos con seres humanos (Morgan, R., 1993, BioPharm, 6 (1): 32-35; véase también The Development of Human Gene Therapy, Theodore Friedmann, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999. ISBN 0-87969-528-5). La seguridad de estos protocolos de terapia génica disponibles actualmente se puede aumentar sustancialmente mediante el uso de vectores retrovirales de la presente invención. Por ejemplo, cuando el vector retroviral infecta una célula no convertida en diana, el genoma retroviral se integrará pero no se transcribirá. Sin embargo, cuando el vector retroviral que contiene un elemento regulador específico de tejido infecta una célula convertida en diana, el promotor específico de tejido activo dará como resultado la transcripción y traducción del genoma viral. Para células en división se usan vectores oncorretrovirales.

Con célula en "división" se quiere decir una célula que se somete a mitosis activa o meiosis. Tales células en división incluyen células madre, células cutáneas (por ejemplo, fibroblastos y queratinocitos), gametos y otras células en división conocidas en la técnica. Son de interés particular y están incluidas por la expresión células en división las células que tienen trastornos proliferativos de células, tales como células neoplásicas. La expresión "trastorno proliferativo de células" se refiere a una afección caracterizada por un número anormal de células. La afección puede incluir crecimiento celular tanto hipertrófico (dando como resultado la multiplicación continua de células una proliferación de una población celular dentro de un tejido) como hipotrófico (una ausencia o deficiencia de células dentro de un tejido) o un flujo de entrada o migración excesiva de células a un área del cuerpo. Las poblaciones celulares no son necesariamente células transformadas, tumorigénicas o malignas, pero pueden incluir asimismo células normales. Los trastornos proliferativos de células incluyen trastornos asociados con un crecimiento excesivo de tejidos conectivos, tales como diversas afecciones fibróticas, que incluyen esclerodermia, artritis y cirrosis hepática. Los trastornos proliferativos de células incluyen trastornos neoplásicos tales como carcinomas de cabeza y cuello. Los carcinomas de cabeza y cuello incluirían, por ejemplo, carcinoma de la boca, esófago, garganta, laringe, glándula tiroides, lengua, labios, glándulas salivales, nariz, senos paranasales, nasofaringe, tumores de cornete nasal superior y de seno, estioneuroblastoma, cáncer de células escamosas, melanoma maligno, carcinoma senonasal no diferenciado (SNUC) o neoplasia sanguínea. También se incluyen carcinomas de los ganglios linfáticos regionales que incluyen ganglios linfáticos cervicales, ganglios linfáticos prelaríngeos, ganglios linfáticos yuxtaesofágicos pulmonares y ganglios linfáticos submandibulares (Harrison's Principles of Internal Medicine (eds. Isselbacher, *et al.*, McGraw-Hill, Inc. 13ª Edición, págs. 1850-1853, 1994). Otros tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de tracto urinario, linfoma de cáncer uterino, cáncer oral, cáncer pancreático, leucemia, melanoma, cáncer de estómago y cáncer ovárico.

La presente invención también se puede usar en terapia génica para el tratamiento de trastornos proliferativos de células. Tal terapia conseguiría su efecto terapéutico por introducción de una secuencia polinucleotídica terapéutica apropiada (por ejemplo, antisentido, ribozimas, genes suicidas) en células del sujeto que tiene el trastorno proliferativo. El suministro de construcciones polinucleotídicas se puede conseguir mediante el uso del vector oncorretroviral con capacidad de replicación recombinante de la presente invención, que es capaz de infectar células en división.

Adicionalmente, los métodos terapéuticos (por ejemplo, los métodos de terapia génica o de suministro de genes) como se describen en este documento se pueden realizar *in vivo* o *ex vivo*. Puede ser preferible eliminar la mayoría de un tumor antes de la terapia génica, por ejemplo, quirúrgicamente o mediante radiación.

Un método para la introducción y expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula diana comprende infectar la célula diana con el oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante de la invención y expresar la secuencia de ácido nucleico heteróloga en la célula diana. Como se ha mencionado anteriormente, la célula diana puede ser cualquier tipo celular que incluye tipos celulares en división, neoplásicas, inmortalizadas, modificadas y otros reconocidos por los especialistas en la técnica, siempre que tengan capacidad de infección por un oncorretrovirus.

Puede ser deseable modular la expresión de un gen en una célula mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico heteróloga) usando la construcción de la invención, donde la secuencia de ácido nucleico da lugar, por ejemplo, a una molécula antisentido o ribozima. El término "modula" incluye la supresión de expresión de un gen cuando se sobre-expresa o aumento de la expresión cuando está subexpresado. Cuando un trastorno proliferativo de células está asociado con la expresión de un gen, se pueden usar las secuencias de ácido nucleico que interfieren con la expresión del gen a nivel de la traducción. Esta estrategia utiliza, por ejemplo, ácido nucleico antisentido, ribozimas o agentes tríplex para bloquear la transcripción o traducción de

ES 2 323 744 T3

un ARNm específico, enmascarando este ARNm con un ácido nucleico antisentido o agente tríplex o escindiendo el mismo con una ribozima.

5 Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub, Scientific American, 262: 40, 1990).

10 En la célula, los ácidos nucleicos antisentido hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula bicatenaria. Los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la traducción del ARNm, ya que la célula no traducirá un ARN que es bicatenario. Se prefieren los oligómeros antisentido de aproximadamente 15 nucleótidos, ya que se sintetizan fácilmente y probablemente causarán menos problemas que moléculas de mayor tamaño cuando se introducen en la célula diana. El uso de métodos antisentido para inhibir la traducción *in vitro* de genes se conoce bien en la técnica (Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172: 289, 1988).

15 El ácido nucleico antisentido se puede usar para bloquear la expresión de una proteína mutante o un producto génico predominantemente activo, tal como proteína precursora de amiloide que se acumula en la enfermedad de Alzheimer. Tales métodos también son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, Parkinsonismo hereditario y otras enfermedades. Es de interés particular el bloqueo de genes asociados con trastornos proliferativos de células. Los ácidos nucleicos antisentido también son útiles para la inhibición de expresión de proteínas asociadas con toxicidad.

20 El uso de un oligonucleótido para parar la transcripción se conoce como la estrategia tríplex ya que el oligómero se coloca alrededor del ADN de doble hélice, formando una hélice de tres cadenas.

25 Por lo tanto, estos compuestos tríplex se pueden diseñar para reconocer un sitio único en un gen seleccionado (Maher, *et al.*, Antisense Res. and Dev., 1(3): 227, 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design, 6 (6): 569, 1991).

30 Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otros ARN monocatenarios de un modo análogo a las endonucleasas de restricción de ADN. Mediante la modificación de secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN es posible crear por ingeniería genética moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindir las mismas (Cech, J. Amer. Med. Assn., 260: 3030, 1988). Una ventaja principal de esta estrategia es que, debido a que son específicas de secuencia, solamente se inactivan los ARNm con secuencias particulares.

35 Puede ser deseable transferir un ácido nucleico que codifica un modificador de respuesta biológica. En esta categoría se incluyen agentes inmunopotenciadores que incluyen ácidos nucleicos que codifican varias de las citoquinas clasificadas como "interleuquinas". Las mismas incluyen, por ejemplo, las interleuquinas 1 a 12. También se incluyen en esta categoría, aunque no trabajando necesariamente de acuerdo con los mismos mecanismos, los interferones y, en particular, interferón gamma (γ -IFN), factor de necrosis tumoral (TNF) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Otros polipéptidos incluyen, por ejemplo, factores angiogénicos y factores anti-angiogénicos. Puede ser deseable suministrar tales ácidos nucleicos a células de médula ósea o macrófagos para tratar deficiencias enzimáticas o defectos inmunes. Los ácidos nucleicos que codifican factores de crecimiento, péptidos tóxicos, ligandos, receptores u otras proteínas fisiológicamente importantes también se pueden introducir en células diana específicas.

45 Para enfermedades debidas a una deficiencia de un producto proteico, la transferencia génica podría introducir un gen normal en los tejidos afectados para terapia de sustitución, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido.

50 La presente invención también encuentra aplicación en terapia génica para el tratamiento de trastornos proliferativos de células o inmunológicos. Tal terapia conseguiría su efecto terapéutico por introducción de un polinucleótido antisentido o que codifica de manera negativa dominante en células que tienen el trastorno proliferativo, donde el polinucleótido se une a y evita la traducción o expresión de un gen asociado con un trastorno proliferativo de células. El suministro de ácidos nucleicos heterólogos útiles para tratar o modular un trastorno proliferativo de células (por ejemplo, polinucleótidos antisentido) se puede conseguir usando un vector oncorretroviral recombinante de la presente invención.

55 Además, la presente invención proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica un vector oncorretroviral recombinante de la presente invención. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador de selección de tal forma que se pueden identificar y generar células transducidas. Insertando una secuencia heteróloga de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector ahora es específico de diana. Los vectores retrovirales se pueden convertir en específicos de diana uniendo, por ejemplo, un azúcar, un glucolípido o una proteína. La dirección se consigue mediante el uso de un anticuerpo o ligando para dirigir el vector retroviral. Los especialistas en la técnica conocerán, o pueden entender de forma sencilla sin experimentación innecesaria, secuencias polinucleotídicas específicas que se pueden insertar en el genoma retroviral o unirse a una envuelta viral para permitir el suministro específico de diana de vector retroviral que contiene el polinucleótido heterólogo. Además, el vector retroviral se puede dirigir a una célula utilizando un elemento regulador específico de célula o tejido contenido en la LTR del genoma retroviral. Preferiblemente, el elemento regulador específico de célula o tejido está en la región U3 de las LTR. De este modo, después de la integración en

una célula, el genoma retroviral se expresará solamente en células en las que el promotor específico de célula o tejido está activo.

Alternativamente, células NIH3T3 u otras de cultivo tisular se pueden transfectar directamente con plásmidos que codifican el genoma retroviral, mediante transfección convencional con fosfato cálcico. Las células resultantes liberan el vector retroviral al medio de cultivo.

Cuando se trata un sujeto que tiene un trastorno proliferativo de células usando las construcciones de la invención, el sujeto puede ser cualquier mamífero y preferiblemente es un ser humano. El sujeto se pone en contacto con un vector oncorretroviral con capacidad de replicación recombinante de la presente invención. La puesta en contacto puede ser *in vivo* o *ex vivo*. Los métodos para administrar el vector de la invención se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, administración sistémica, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intramuscular, así como administración directamente en el sitio de un tumor o trastorno proliferativo de células y otras vías de administración conocidas en la técnica.

Por tanto, las aplicaciones de la invención incluyen diversas composiciones farmacéuticas útiles para tratar un trastorno proliferativo de células. Las composiciones farmacéuticas se prepararon llevando un vector retroviral que contiene una secuencia polinucleotídica heteróloga útil para tratar o modular un trastorno proliferativo de células de acuerdo con la presente invención hasta una forma adecuada para administración a un sujeto usando vehículos, excipientes y aditivos o auxiliares. Los vehículos o auxiliares usados frecuentemente incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteína láctea, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilenglicoles y disolventes, tales como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen soluciones de reemplazo de fluido y nutrientes. Los conservantes incluyen antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, que incluyen sales, conservantes, tampones y similares como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed. Easton: Mack Publishing Co., 1405-1412, 1461-1487 (1975) y The National Formulary XIV., 14^a ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975), cuyos contenidos se incorporan en este documento como referencia. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la especialidad rutinaria en la técnica. Véase Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7^a ed.).

Por ejemplo, y no a modo de limitación, un vector retroviral útil para tratar un trastorno proliferativo de células incluirá una proteína ENV específica de diana quimérica dirigida a un tipo celular de interés (por ejemplo, uno que tenga un trastorno proliferativo de células), proteínas GAG y POL, una secuencia de promotor específico de células en la región U3 de la LTR del genoma retroviral asociado con un gen regulador del crecimiento (por ejemplo, probasina o HER2) y una secuencia que actúa en *cis* necesaria para la replicación, el empaquetamiento y la integración del genoma retroviral en la célula diana. La secuencia heteróloga puede ser, por ejemplo, una molécula antisentido o una proteína suicida que da como resultado la muerte de una célula en la que se transcribe activamente el genoma retroviral.

Los siguientes Ejemplos tienen por objeto ilustrar, pero no limitar la invención. Aunque tales Ejemplos son típicos de los que se pueden usar, alternativamente se pueden utilizar otros procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de Retrovirus con capacidad de Replicación

Existen pocas publicaciones en la bibliografía con respecto a la estabilidad de inserciones en el contexto de MoMLV con capacidad de replicación y todas han usado posiciones de inserción dentro de la secuencia de repetición larga (LTR) 3'. La mayoría de estas inserciones se deleccionaron en el intervalo de uno o dos pases seriados del virus. En este caso, el tamaño y la naturaleza de las secuencias insertadas parecían tener poca correlación con la estabilidad del vector, ya que insertos pequeños frecuentemente se deleccionaron tan rápidamente como insertos de mayor tamaño. Una consideración importante puede ser la colocación de la inserción; ya que el proceso de transcripción inversa incluye la duplicación de la región U3 de la LTR 3' (Figura 1), esto puede dar como resultado estabilidad disminuida de secuencias no esenciales insertadas en esta posición.

Un clon proviral de Mo-MLV infeccioso se escindió con *NheI* del plásmido pZAP y se ligó en la cadena principal plasmídica del vector retroviral gIZIN. El IRES del virus de encefalomiocarditis se amplificó por PCR a partir del plásmido pEMCF y se unió en su extremo 3' a un polienlazador por PCR de extensión por solapamiento. Los plásmidos gIZIN y pEMC-F se proporcionaron amablemente por J. J. Hwang, Universidad de California del Sur. Todas las reacciones de PCR se realizaron con ADN polimerasa de *Pfu* (Stratagene). Después se introdujo el polienlazador de IRES en el clon de Mo-MLV en el extremo 3' del gen *env* por PCR de extensión por solapamiento. El plásmido resultante se denominó gIZD. El gen de GFP del plásmido pEGFP-N1 (Clontech) se amplificó por PCR y se insertó en el sitio de clonación múltiple de gIZD, produciendo gIZD-GFP. El gen de higromicina fosfotransferasa del plásmido pTK-higro (Clontech) se introdujo de forma similar en gIZD para producir gIZD-higro. El prefijo p se omite en la denominación de los virus obtenidos de estos plásmidos.

ES 2 323 744 T3

La inserción de un transgén en una posición menos sensible, y de hecho, uniendo la expresión del transgén insertado a secuencias codificantes virales, puede mejorar la estabilidad del vector. En consecuencia, una secuencia IRES se insertó justo cadena abajo del mensaje de envuelta pero cadena arriba de la LTR 3' (Figura 2). Un IRES obtenido de virus de encefalomiocarditis (EMCV) y un sitio de clonación múltiple se insertaron justo a 3' del gen de envuelta en un clon de provirus de MoMLV con capacidad de replicación, gIZD (MoMLV de tipo silvestre, véase la Figura 1). La cepa gIZD del virus MoMLV es ecotrópica (es decir, recubierta por una envuelta con tropismo de unión específico murino). Esta posición de inserción particular se seleccionó debido a que 1) se conoce que la señal de empaquetamiento se extiende más allá del ATG del gen gag, por tanto, la colocación de un transgén justo cadena arriba del gen gag mejoraría en gran medida la eficacia de empaquetamiento, 2) las secuencias codificantes de gag y pol se traducen inicialmente como un único polipéptido que después se escinde, la colocación de un transgén entre estas posiciones mejoraría por tanto en gran medida el procesamiento proteolítico, 3) el extremo 3' del gen pol de hecho se solapa con el extremo 5' del gen env y esta región de solapamiento contiene un aceptor de corte y empalme para el transcrito de env, por tanto, las inserciones de transgén en esta región serían problemáticas y 4) la colocación del inserto en el exterior del intrón principal garantiza la presencia del inserto en ARN virales tanto empalmados como no empalmados y, por lo tanto, la traducción del inserto de ARN.

La construcción resultante se denominó gIZD. El sitio de clonación múltiple en gIZD se usó después para insertar secuencias codificantes de transgén. El sitio de clonación múltiple en el gIZD se usó después para insertar secuencias que codifican transgén. En este sitio se insertaron genes marcadores inicialmente tales como el gen de proteína verde fluorescente (GFP), gen de resistencia a puromicina (puro[®]) y gen de resistencia de higromicina (higro[®]). Los genes suicidas, tales como el gen de timidina quinasa de virus de Herpes simples (HSV-tk) y el gen de nucleótido purina fosforilasa de *E. coli* (PNP) se pueden insertar en lugar de los genes marcadores. Ya que los transgenes tienen diversos tamaños, dando como resultado inserciones de casete de IRES+transgén que varían de 1170 pb a 1700 pb de tamaño, se puede determinar si el tamaño del inserto tiene un efecto sobre la estabilidad del genoma del virus (normalmente de 8,3 kb de tamaño) y cuál podría ser el límite de empaquetamiento para MoMLV en este contexto. Ha habido pocas publicaciones en la bibliografía con respecto a la estabilidad de inserciones en el contexto de MoMLV con capacidad de replicación y ninguna, de la que sean conscientes los inventores, que use una secuencia IRES para dirigir la expresión de transgén en vectores con capacidad de replicación. Este diseño de construcción mejora en gran medida la estabilidad funcional y genética del transgén.

Los vectores de retrovirus con capacidad de replicación (RCR) obtenidos de gIZD se ensayaron en primer lugar para determinar su capacidad para replicarse de forma eficaz y propagarse en cultivo. Se cultivaron células NIH3T3 y 293T en medio de Eagle Modificado por Dulbecco con suero fetal bobino al 10%. Se produjo solución madre de vector por introducción por transfección de los plásmidos que codifican el vector en células 293T usando precipitación con fosfato cálcico como se ha descrito previamente. Veinticuatro horas post-transfección, el medio se sustituyó con medio recién preparado y un día después se recogió el sobrenadante que contenía vector, se filtró a través de un filtro de 0,45 μm y se usó inmediatamente o se congeló para uso posterior. Después de la introducción inicial por transfección de los plásmidos de vector RCR en células 293 para producir una solución madre viral se usó una dilución de factor 1000 de la preparación de virus para infectar placas frescas de células NIH3T3. Las células se cultivaron hasta confluencia, el sobrenadante del cultivo celular que contenía RCR se recogió para ensayar actividad de transcriptasa inversa (RT) y después se sometieron a pases las células. Este ciclo se repitió varias veces hasta que cada conjunto de células sometidas a pases consiguiera de nuevo la confluencia.

Se usaron diluciones de las soluciones madre de vector para infectar células NIH3T3 confluentes al 20%. Cada 3 días durante las siguientes 2 semanas, se recogió el sobrenadante y las células se dividieron 1:4. Para cuantificar la actividad de transcriptasa inversa se incubó una alícuota de cada sobrenadante a 37°C durante una hora en un combinado que contenía (³²p)dTTP, molde poli(rA) y cebadores oligo-dT. La actividad de RT se cuantificó usando molde poli-riboA y un cebador oligo-dT para incorporación de dTTP radiomarcados y los productos de reacción se aplicaron puntualmente sobre nitrocelulosa y se midió la radiactividad por PhosphorImager. El desarrollo en el tiempo de actividades de RT a lo largo de varios pases muestra un patrón clásico de pico y meseta, indicando de este modo que todos los vectores RCR obtenidos de gIZD que llevan genes marcadores son capaces de replicación eficaz y propagación a lo largo de un cultivo celular a niveles comparables con el virus de tipo silvestre (Figura 3). Por tanto, incluso inserciones relativamente grandes, que extienden la capacidad de empaquetamiento de MoMLV hasta su límite, no parecen alterar la capacidad de replicación del virus.

El vector RCR obtenido de gIZD que contiene GFP como el gen marcador (gIZD-GF) se usó para seguir la expresión del transgén a lo largo del tiempo cuando el virus se propagó a lo largo del cultivo de células NIH3T3. El marcador de GFP se puede detectar por análisis de separador de células activadas por fluorescencia (FACS) usando la misma longitud de onda que la usada para la detección de fluoresceína (FITC; canal FL1). Las células NIH3T3 se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se tripsinizaron y recogieron por centrifugación a baja velocidad. Las células se resuspendieron en PBS a aproximadamente 10⁵ células/ml y se analizaron para determinar la fluorescencia con un Becton Dickinson FACScan usando un conjunto de filtros de isotiocianato-fluoresceína. Estos resultados muestran que los niveles de transducción iniciales a una dilución alta de la solución madre de virus son extremadamente bajos (aproximadamente el 3%) el Día 2, pero la expresión en el cultivo aumentó rápidamente a lo largo del tiempo, como se observa por el pico desplazado de fluorescencia media, de tal forma de que el Día 7, prácticamente el 100% del cultivo está expresando GFP (Figura 4). Por tanto, esto indica que la expresión de transgén no se pierde cuando el vector RCR se propaga a lo largo del cultivo celular y, de hecho, el transgén se suministra de forma eficaz a prácticamente todas las células incluso con niveles de transducción iniciales bajos (Figuras 5 y 6).

Ejemplo 2

Construcción de vectores RCR dirigidos a células de cáncer de mama humano

5 Se utilizaron secuencias *env* de MoMLV y SNV quiméricas que contenían restos de dirección dirigidos contra células de cáncer de mama humano y que se ha demostrado que son exitosas para la dirección en estudios previos. El resto de dirección para *env* de MoMLV fue la hormona peptídica heregulina y el resto de dirección para *env* de SNV fue el anticuerpo de cadena única B6.2, obtenido originalmente inmunizando ratones con una fracción enriquecida en membrana de un tumor de mama humano. Usando una secuencia IRES, un gen marcador (tal como GFP) o un gen suicida (tal como HSV-tk o PNP) se une a la construcción de envuelta quimérica en el extremo 3'. Estas construcciones quiméricas de envuelta/IRES/transgén se vuelven a re-clonar después en las formas de tipo silvestre con capacidad de replicación de MoMLV o SNV, sustituyendo el gen *env* original (Figura 2b). Esto da como resultado vectores de retrovirus con capacidad de replicación que se dirigen específicamente a células cancerosas.

15 Los tumores se establecieron mediante la inyección de $1,5 \times 10^6$ células de adenocarcinoma de mama de rata NMU por vía subcutánea en los flancos anteriores de ratones de 6 semanas de edad nu/nu BALB/c (Simonsen Laboratories). Cuatro semanas después, los tumores habían crecido hasta 100-150 mm³, en cuyo momento se les inyectó 80 μ l de sobrenadante de células NIH3T3 infectadas con g1ZD-GFP que contenían 1×10^4 de vector PFU. A intervalos regulares después de esto se eutanasiaron subconjuntos de los ratones y sus tumores se retiraron quirúrgicamente. Para producir suspensiones de célula única, toda la masa de cada tumor se trituró finamente y se incubó durante una hora a 37°C en cinco volúmenes de solución salina equilibrada de Hank (HBSS) que contenía 100 U/ml de collagenasa IV. Después, las células propagadas se lavaron y resuspendieron en PBS para análisis por citometría de flujo.

25 Aunque Kasahara *et al.* (Science, 266: 1373-1376 (1994)) y Chu *et al.* (Journal of Virology, 69: 2659-2663 (1995)) han observado que la co-expresión de envuelta de MoMLV de tipo silvestre se requiere habitualmente para procesar y transportar de forma apropiada las construcciones de envuelta de MoMLV quiméricas hasta la superficie de las células productoras y, posiblemente, también para la función apropiada durante la entrada, algunos grupos han sido capaces de recubrir viriones solamente con envuelta quimérica insertando la secuencia de ligando en el extremo amino-terminal de la envuelta de MoMLV. La estrategia se usó para construcción de la envuelta de heregulina/MoMLV a usar en los vectores con capacidad de replicación. Además, aunque MoMLV es el retrovirus convencional usado en la mayoría de los protocolos de terapia génica, SNV es ventajoso para la dirección debido a las siguientes características: 1) su capacidad de empaquetamiento máxima es mayor que la de MoMLV y, por tanto, puede tolerar las secuencias adicionales y genes sin pérdida espectacular de título, 2) se ha observado que la envuelta de SNV es extremadamente estable, tolerando truncamientos principales sin pérdida de la capacidad de ensamblarse de forma apropiada en la superficie de la célula de empaquetamiento y se ha demostrado que las construcciones de envuelta de SNV quimérica contienen secuencias de ligando exógenas que se pueden expresar sin necesidad de envuelta de SNV de tipo silvestre y 3) se considera que SNV de tipo silvestre es completamente no patógeno para seres humanos (Bacus *et al.*, Am. J. Clin. Pathol., 102: S13-24 (1994)).

Ejemplo 3

Creación de líneas celulares productoras de vector RCR

45 Las anteriores construcciones genómicas de MoMLV y SNV se introducen por transfección en la línea celular de cáncer de mama humano MD-MB-453 (número de acceso de la ATCC HTB 131), que expresa altos niveles de HER-2 y HER-4 (Krause *et al.*, EMBO Journal, 6: 605-610 (1987)). Las construcciones que contienen el gen marcador de GFP se transfecan en primer lugar, ya que la presencia del gen marcador permite controlar la eficacia de transfección por análisis FACS. Después de la transfección, los vectores RCR dirigidos producidos por los transfectantes primarios son capaces de infección horizontal de células adyacentes no transfectadas inicialmente, por unión por la heregulina o los restos de anticuerpo de cadena única B6.2. Esto se puede detectar como un porcentaje creciente de células positivas a GFP a lo largo del tiempo. Además, el medio de cultivo celular debe contener virus sobrenadante, que puede infectar y transducir cultivos recién preparados de células MDA-MB-453. Los vectores que contienen GFP, por tanto, permiten determinar el curso temporal de acontecimientos de transfección e infección y la velocidad de la propagación del virus a lo largo del cultivo celular de cáncer de mama humano. Basándose en esta información se realicen estudios similares con los vectores que contienen HSV-tk y PNP y, en este caso, la transducción se controla por transferencia de Southern o PCR cuantitativa para secuencias de vector integrado. Los transgenes de HSV-tk y PNP también se ensayan funcionalmente determinando si se ha conferido sensibilidad a los profármacos ganciclovir y 6-metil-purina-desoxirribósido, respectivamente.

Ejemplo 4

Ensayo de especificidad tisular del virus en cultivo

65 Se usa el medio de cultivo celular de células MDA-MB-453 que producen virus para infectar una diversidad de células diana humanas, para determinar la especificidad tisular de los vectores de virus. Como un virus de control negativo, las células diana se exponen a vectores MoMLV y SNC ecotrópicos de tipo silvestre que contienen el gen marcador de GFP y, como virus de control positivo, las células diana se infectan con un vector de MoMLV anfotrópico que contiene GFP.

ES 2 323 744 T3

Las células diana de nuevo son la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-453 que, como se ha indicado anteriormente, sobre-expresa tanto HER-2 como HER-4 y, como una línea celular de control negativo, la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 (número de acceso de la ATCC HTB26), que no expresa ningún HER-2 o HER-4 detectable. No se observa infectividad de fondo con los controles de vector de MoMLV o SNV ecotrópicos de tipo silvestre; por tanto, la infección exitosa por los vectores quiméricos depende de la interacción específica entre la heregulina o los restos de dirección de anticuerpo de cadena única B6.2 en la envuelta del virus y su receptor o antígeno correspondiente sobre las células diana. Otras líneas celulares de cáncer de mama humano que se usan como dianas incluyen BT474 (que sobre-expresa tanto HER-2 como HER-4) y MCF7 (que solamente expresa HER-4). Además se usan líneas celulares de control negativo que son de origen humano pero que no se obtienen de epitelio mamario para ensayar adicionalmente la especificidad tisular de la invención.

Como se ha señalado anteriormente, las células infectadas se examinan por análisis FACS para expresión de GFP o se ensayan para transducción de HSV-tk o PNP por transferencia de Southern o PCR cuantitativa y por exposición a ganciclovir o 6-metil purina-desoxirribósido.

Ejemplo 5

Dirección de RCRV por incorporación de elementos de promotor específico de tejido

El tropismo retroviral se puede re-dirigir alterando la actividad de la transcripción del virus mediante sustitución de regiones de la repetición terminal larga (LTR) viral con elementos de promotor específico de células. Esta estrategia se ha usado por otros grupos para dirigir la transcripción retroviral a tipos de células tumorales particulares.

Las secuencias LTR provirales de MoMLV consisten en 3 regiones distintas, denominadas U3, R y U4 que se repiten en cada extremo del genoma. Los elementos de promotor que controlan la transcripción del genoma de ARN y, por lo tanto, la replicación del virus, permanecen en la región U3. La región R contiene el sitio de inicio de la transcripción y, por tanto, la región U3 cadena arriba no está incluida en el transcrito de ARN genómico. Sin embargo, el transcrito se lee a través de la secuencia U3 en la LTR 3', que también contiene señales de poliadenilación y la región U3 de LTR 3' se re-duplica en el extremo 5' durante el proceso de la transcripción inversa. Por tanto, para que las alteraciones en el promotor de LTR sean permanentes a lo largo de ciclos de replicación seriados, las alteraciones se incorporan en la región U3 de la LTR 3'.

En la presente invención se incorporan elementos con especificidad tisular en la región U3 de LTR 3' para dirigir la replicación del vector RCR. Como un ejemplo práctico se muestra la transcripción dirigida a células de cáncer de próstata. Usando la especificidad de elementos específicos de próstata que se activan en *trans* que interaccionan con secuencias de promotor que actúan en *cis* (elementos de respuesta a andrógenos), los investigadores han sido capaces de conseguir la dirección transgénica específica de tejido de proteínas oncogénicas (Greenberg *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3439-43 (1995); y Garabedian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95: 35382-7 (1998)). Una de las proteínas mejor caracterizadas producida de forma única por la próstata y regulada por secuencias de promotor que responden a señales específicas de próstata es la proteína probasina de rata. El estudio de la región de promotor de probasina ha identificado sitios de regulación de la transcripción específicos de tejido y ha conseguido una secuencia de promotor útil para la expresión génica específica de tejido. La secuencia de promotor de probasina que contiene las bases -426 a +28 de la región no traducida 5' se ha estudiado exhaustivamente en ensayos de gen indicador CANT (Rennie *et al.*, Mol Endo, 7: 23-36 (1993)). Se ha publicado la expresión específica de próstata en modelos de ratón transgénico usando el promotor de probasina (Greenberg *et al.*, Mol Endo. 8: 230-9 (1994)). Los niveles de expresión génica en estos modelos son paralelos a la maduración sexual de los animales con una expresión génica aumentada 70 veces observada en el momento de la pubertad (2-6 semanas). La castración de los animales disminuirá la expresión génica prácticamente hasta cero, que se puede aumentar hasta niveles pre-castración después de la administración parenteral de testosterona. El promotor de probasina (-426 a +28) se ha usado para establecer el modelo de ratón transgénico de cáncer de próstata que usa el gen fusionado de promotor de probasina-antígeno T grande de virus de simio 40 para sobre-expresión dirigida en la próstata de líneas transgénicas estables (Greenberg *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3439-43 (1995)). Por tanto, esta región del promotor de probasina se incorpora en la región U3 de LTR 3' de los vectores RCR. Por tanto, se proporciona un vector MoMLV con capacidad de replicación dirigido por elementos de promotor específicos de tejido.

Ejemplo 6

Incorporación de elementos de promotor específicos de próstata en la LTR de RCRV

Un fragmento del promotor sensible a andrógeno de probasina de rata (de -426 a +28) que se ha demostrado que especifica la expresión génica específica de próstata se ha introducido por ingeniería genética en la región U3 de la LTR 3' retroviral en vectores RCR tanto ecotrópicos como anfotrópicos. El extremo 5' de la región U3 se reconoce por la proteína integrasa viral y, de este modo, se usó PCR de extensión por solapamiento para poder colocar de forma precisa el promotor de probasina justo cadena abajo del comienzo de la región U3 en la LTR 3', sustituyendo el resto de la secuencia U3 hasta la región R. Ya que se pone inicialmente cadena abajo, esta región U3 modificada no será funcional después de la introducción por transfección de la construcción del provirus en células 293 y la producción del transcrito del vector tendrá lugar de forma normal, pero después de un único ciclo de replicación, la secuencia de probasina se re-duplicará en la región U3 de la LTR 5' (Figura 8) y, después, debe especificar la replicación específica

de células de próstata del virus. Se han construido vectores RCR dirigidos por probasina que contienen el casete de gen marcador IRES-GFP de EMCV; en este caso, la región U3 en la LTR 5' de gIZD-GFP se sustituyó en primer lugar con un promotor de CMV (cIZD-GFP) para eliminar el sitio The I en la LTR 5' (y también para mejorar la expresión y los títulos después de la transfección inicial en células 293), de tal forma que ahora, el sitio Nhe I en la LTR 3' es único y se puede usar para insertar el fragmento de promotor de probasina (Figura 9, panel superior: sustitución de la región U3 3' con el promotor de probasina por PCR de extensión por solapamiento; panel inferior: secuencia de la LTR 3' en pIZD-GFP, que muestra la unión de promotor de probasina/región R). En este contexto se debe señalar que, aunque las inserciones de transgenes no esenciales en la región U3, de hecho, tienden a delección, el promotor de probasina sustituirá completamente en este caso los elementos de promotor de tipo silvestre en la LTR viral, por lo tanto, las delecciones del promotor de probasina darían como resultado simplemente un virus que no tiene capacidad de replicación, por tanto, habría presión de selección frente a tales delecciones. Hasta lo que conocen los inventores, esto representaría el primer ejemplo de un vector retroviral de replicación controlado por regulación de la transcripción.

Un fragmento del promotor sensible a andrógenos de probasina de rata se construyó por amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico usando los cebadores ATCCACAGTTCAGGTT CAATGGCG y CTGCTACCTTCTTTTGTGAGATTCTTGTCTGTCATCATACTGG. Como se ha discutido anteriormente, éste es el mismo fragmento de promotor (de -426 a +28) que especifica la expresión de oncogén específica de próstata en el ratón transgénico con antígeno T de SV-40-probasina. Se añadió una secuencia enlazadora *NheI-SfiI* al cebador 5' mientras que se añadió un sitio *AflIII* al extremo 3' del cebador 3'. Este producto de PCR se insertó en el plásmido de expresión pcDNA3.1+ (Invitrogen) después de una digestión con *NheI-AflIII*. La presencia del inserto de probasina se confirmó por digestión por restricción con *NheI-AflIII* para aislar el fragmento de 550 pb.

Esta secuencia de promotor de probasina se introduce por ingeniería genética en la región U3 de la LTR 3' retroviral por PCR de extensión por solapamiento tanto en gIZD-GFP como en gIZA-GFP y también en las construcciones de vector GIZD y gIZA que contienen los genes terapéuticos de PNP o HSV-tk. El extremo 5' de la región U3 se reconoce por la proteína integrasa viral y, de este modo, se usará la PCR de extensión por solapamiento para poner de forma precisa el promotor de probasina justo cadena abajo del comienzo de la región U3 en la LTR 3', sustituyendo el resto de la secuencia U3 hasta la región R. Esta U3 modificada no será funcional después de la transfección inicial de la construcción de vector RCR en células 293, pero después de un ciclo de replicación, la secuencia de probasina se duplicará en la región U3 de la LTR 5' y, por lo tanto, debe especificar replicación específica de célula de próstata del virus. La construcción se introduce por transfección en células 293 y se recoge el sobrenadante para ensayar la especificidad de tipo celular de la replicación viral, como se describe más adelante.

Ejemplo 7

Ensayo de la especificidad tisular del RCRV dirigido por transcripción en cultivo

Para confirmar que el promotor de probasina de 430 pb todavía tendría capacidad de expresión específica de próstata, inducible por andrógenos después de incorporarse en la repetición terminal larga (LTR) retroviral, se construyó este promotor híbrido y se usó para dirigir la expresión de un gen indicador de luciferasa. Como se indica en la Figura 10, esta construcción se ensayó en líneas celulares tanto prostáticas como no prostáticas en presencia y ausencia de estimulación con andrógenos. En la Figura 11 se muestra un conjunto representativo de resultados; los resultados confirman que el promotor híbrido de LTR-probasina es activo con estimulación con andrógenos solamente en líneas celulares de próstata, mientras que las líneas celulares no prostáticas muestran poca activación incluso en presencia de estimulación con andrógenos. Se obtuvieron resultados similares con las demás líneas celulares ensayadas.

Después, el promotor híbrido de probasina-LTR se incorporó en vectores RCR que llevan el gen marcador de proteína verde fluorescente (GFP), por sustitución de la LTR 3', de tal forma que tendría lugar la expresión dirigida por probasina solamente después de un ciclo de transcripción inversa y la re-duplicación de la LTR 3' en el extremo 5'. Como se muestra en la Figura 12 se generaron preparaciones de virus a partir de estas construcciones recogiendo el medio sobrenadante 48-72 horas después de la transfección transitoria de células 293T. Estas preparaciones de virus se filtraron para excluir restos celulares y después se usaron para infectar líneas celulares de cáncer de próstata murino (TRAMP-C). La expresión de GFP en las células TRAMP-C infectadas se examinó por análisis de separador de células activadas por fluorescencia (FACS) en presencia y ausencia de estimulación con andrógenos. Como se muestra en la Figura 13, tuvo lugar un desplazamiento en la fluorescencia que indica expresión del gen marcador de GFP en las células de próstata infectadas solamente después de la estimulación con andrógenos.

Además, las construcciones genómicas se usaron para la infección de la línea celular de cáncer de próstata humano LnCaP, que expresa altos niveles del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y soporta un alto nivel de expresión del promotor de probasina. Los vectores RCR que contienen el gen marcador de GFP se usaron en primer lugar para la infección, ya que la presencia del gen marcador permitirá controlar la eficacia de transducción por análisis FACS. Después de transducción inicial, los vectores RCR dirigidos producidos por los transfectantes primarios tienen capacidad de infección horizontal de células adyacentes no transfectadas inicialmente. Esto se detecta como un porcentaje creciente de células positivas a GFP a lo largo del tiempo. Además, el medio de cultivo celular contendrá virus sobrenadante, que puede infectar y transducir cultivos frescos de células LnCaP. Por tanto, los vectores que contienen GFP permitieron la determinación del ciclo temporal de los acontecimientos de transfección e infección y la velocidad de propagación de virus a lo largo del cultivo celular de cáncer de próstata. Basándose en esta información se realizan estudios similares con los vectores de gen suicida que contienen HSV-tk y PNP y, en este caso, la transducción

ES 2 323 744 T3

se controla por transferencia de Southern o PCR cuantitativa para secuencias de vector integrado. Los transgenes de HSV-tk y PNP también se ensayan funcionalmente determinando si se confiere sensibilidad a los profármacos ganciclovir y 6-metilpurina-desoxirribósido, respectivamente.

- 5 Los vectores RCR dirigidos también se usan para infectar una diversidad de células diana no prostáticas, para confirmar la especificidad tisular de los vectores de virus. Como un virus de control, las células diana se exponen a vectores MoMLV ecotrópicos o anfotrópicos de tipo silvestre que contienen el gen marcador de GFP.

Ejemplo 8

10

*Transducción de tumores de próstata *in vivo**

Para estudiar la transducción *in vivo*, están disponibles varios modelos que imitan los diversos aspectos clínicos de cáncer de próstata e incluyen modelos espontáneos de roedores, sistemas de xenoinjerto humanos que usan hospedadores murinos inmunocomprometidos y modelos transgénicos murinos. El modelo de roedor de Dunning R-3327 para adenocarcinoma de la próstata implica el uso de tumores implantados por vía subcutánea en ratas Copenhagen (Dunning, W., Natl. Cancer Inst., 12: pág. 351 (1963)). Este modelo permite el estudio de progresión independiente de andrógenos y el proceso de formación de metástasis usando las sublíneas MAT-Lyly o MAT-lu (Smolev *et al.*, Cancer Treat. Rep., 61, 273 (1977)).

20

Además, el desarrollo exitoso de modelos de animales transgénicos que tienen capacidad de desarrollo espontáneo de cánceres de próstata que se parecen a adenocarcinomas humanos ha dependido de la expresión de transgén específica de tejido. En particular, el promotor de probasina que dirige el antígeno T de SV40 se ha usado para establecer un modelo de ratón transgénico de cáncer de próstata. Este modelo bien estudiado demuestra tumores de próstata espontáneos histológicamente similares a los desarrollados en seres humanos, aunque carece de la base hormonal subyacente o desempeña un papel central en los inicios de tumor de próstata. La eficacia *in vivo* de los RCRV dirigidos por transcripción se puede demostrar usando este modelo.

25

Los ratones transgénicos macho en la pubertad se controlan para el desarrollo de tumores de próstata. A los tumores se inyectan vectores MoMLV o SNV con capacidad de replicación dirigidos que llevan GFP o preparaciones de virus de control negativo y positivo y la transducción se ensaya después de otras dos semanas. En ese momento, los animales se eutanasian y se recogen los tumores. Las muestras tisulares de tumores expuestos a vectores virales que llevan el gen de GFP se congelan instantáneamente en nitrógeno líquido y las secciones congeladas se examinan histológicamente con microscopía de fluorescencia con UV. Basándose en estos resultados se realizan experimentos similares usando los vectores RCR dirigidos que llevan HSV-tk o PNP. En este caso, dos semanas después, los xenoinjertos se exponen a vectores virales que llevan el gen de HSV-tk o PNP, se administra ganciclovir o 6-metil purina-desoxirribósido a los animales y se evalúa el alcance de reducción de los tumores. Los grupos de control se dejan sin tratar como un control para el crecimiento del tumor.

30

35

40

La eficacia de transducción aumentada mediante el uso de vectores restringidos por diana, retrovirales, con capacidad de replicación representaría una mejora significativa en el diseño de vectores. Ya que las células tumorales infectadas inicialmente, a su vez, producen más virus, esta estrategia se aprovecha del proceso de amplificación inherente al ciclo de vida de virus de tipo silvestre. La dirección del retrovirus específicamente y exclusivamente a células tumorales limita y controla el proceso de replicación y el uso de virus normalmente no patógenos como la base para esos vectores, así como la incorporación de genes suicidas en los vectores como un mecanismo de “autodestrucción” proporciona defensas adicionales que minimizan el riesgo para células normales.

45

Ejemplo 9

50

Propagación intratumoral de los RCRV en modelo de cáncer de mama

También se realizó la aplicación *in vivo* de vectores MoMLV con capacidad de replicación por inyección intratumoral en tumores sólidos obtenidos de células NMU de rata (cáncer de mama inducido por nitrosometilurea) en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de ratón atímico. Se conoce que las células NMU son tumorigénicas en ratones atímicos. Los ratones atímicos se anestesiaron y se realizó una inyección subcutánea de 2×10^6 células NMU en suspensión de PBS para establecer los tumores. Se dejó que los tumores crecieran hasta aproximadamente 1 cm de diámetro a lo largo de un periodo de 4 semanas, punto en el cual se administró el vector RCR g1ZD-GFP por inyección intratumoral de 100 μ l de la preparación de vector.

55

60

El título de la preparación de vector g1ZD-GFP fue 10^5 /ml de título por ensayo de sincitios celulares XC, por lo tanto, esto constituye un inóculo total de solamente 10^4 unidades infecciosas de virus. En este caso, teniendo en cuenta el crecimiento de tumor y la división celular después del establecimiento inicial, una estimación conservativa de la multiplicidad de infección (MOI) sería del orden de al menos 0,001 (y, probablemente, del orden del 0,0001). Por tanto, se esperaría que la eficacia de transducción inicial fuera de tan solo, o inferior, al 0,1%. De nuevo, este inóculo inicial de sobrenadante de virus se puede comparar con las bajas eficacias de transducción obtenidas en los experimentos clínicos usando inyección intratumoral de líneas de células de empaquetamiento PA317 para transducir glioblastoma.

65

Se dejaron crecer los tumores durante diversos intervalos después de la inyección del vector y se eutanasió un conjunto de ratones y los tumores se recogieron en los puntos de tiempo post-inyección de la semana 2, semana 4 y semana 6. Después de la recogida del tumor, los tumores se cortaron y algunas muestras de tumor se congelaron inmediatamente para aislamiento posterior de ADN genómico y análisis por transferencia de Southern. Las demás muestras de tumor se trituraron, se trataron inmediatamente con colagenasa durante 3-4 horas para disgregar las células de tumor mientras que todavía eran viables, se lavaron y resuspendieron en PBS y se examinaron por análisis FACS esa misma tarde. Por tanto, la propagación horizontal del vector de virus después de la disgregación de las células tumorales probablemente no había afectado a los resultados y no había transcurrido suficiente tiempo para la entrada retroviral, integración y expresión de transgén de GFP antes del análisis FACS.

Los resultados se muestran en la Figura 7: aunque en el punto de tiempo de 2 semanas, solamente un pequeño porcentaje de células parece mostrar inicialmente un desplazamiento en la fluorescencia, la transferencia de genes altamente eficaz a lo largo de todo el tumor se evidencia por análisis FACS de células tumorales disgregadas 4-6 semanas después de la inyección del inóculo inicial. Se detectaron bandas genómicas intactas, de longitud completa en transferencias de Southern de ADN proviral aislado de tumores individuales en los puntos de tiempo 4 y 6 semanas. Esto indica que el vector RCR tenía capacidad de replicación eficaz y suministro de genes en el contexto de tumores sólidos *in vivo* sin que tuvieran lugar deleciones durante este intervalo de tiempo y proporciona un ejemplo ilustrativo del potencial poder de esta estrategia para terapia génica del cáncer, especialmente teniendo en cuenta la MOI extremadamente baja del inóculo inicial.

Ejemplo 10

Variaciones de secuencia IRES

Como se ha descrito anteriormente, se construyeron vectores variando el tamaño del genoma viral. Mediante el uso de secuencias IRES más cortas que el IRES de EMCV presente en las anteriores construcciones, puede ser posible insertar transgenes de mayor tamaño que GFP o grandes secuencias de dirección específicas de tipo celular. Se construyeron dos nuevos vectores usando secuencias IRES de los genes de BiP (Yand y Sarnow, 1997) y VEGF (Stein *et al.*, 1998) (Figura 14). El vector que contiene IRES de BiP, ZB-GFP, y el vector que contiene IRES de VEGF ZV-GFP, son 450 pb y 380 pb más cortos que g1ZD-GFP, respectivamente. La infección de células NIH3T3 por los vectores demostró que ambos transducen de forma eficaz las células y expresan GFP, aunque los niveles de expresión de transgenes son ligeramente inferiores que con g1ZD-GFP (Figura 15). La capacidad de ZB-GFP y ZV-GFP de conservar sus secuencias IRES-GFP durante la propagación de vector se determinó realizando infecciones seriadas de células NIH3T3 con los vectores. Se preparó ADN proviral (Hirt) a partir de 13 poblaciones de NIH3T3 infectadas de forma seriada y se sometió a análisis de Southern usando una sonda para la región de LTR-gag de Mo-MLV. La Figura 16 muestra que las secuencias IRES-GFP de los dos nuevos vectores se conservaron durante aproximadamente el mismo número de infecciones seriadas que para ZAPd-GFP.

Esto indicó que una reducción en el tamaño del IRES en estos vectores no altera significativamente la estabilidad del vector, pero puede permitir la inserción de transgenes de mayor tamaño que GFP.

Ejemplo 11

Vectores RCR dirigidos a células de tumor de mama mediante el uso de dos tipos de modificación en la Proteína de envuelta

Para obtener vectores RCR dirigidos a células de tumor de mama se construyeron vectores que contenían modificaciones en el gen de envuelta que permitirían la unión específica de partículas de vector a proteínas expresadas sobre la superficie de células de tumor de mama. Se usaron dos estrategias para la dirección de los vectores. La primera estrategia implica la inserción de secuencias que codifican el dominio de unión a IgG ("dominio Z", Nilsson *et al.*, 1987) de la proteína A de *S. aureus* en la región rica en prolina (PRR o "bisagra") del gen de envuelta (Figura 17). La presencia del dominio Z sobre la superficie del vector permitiría la unión de anticuerpos específicos de tumor al vector y, por lo tanto, probablemente permitiría la unión específica del vector a células tumorales por el anticuerpo. La segunda estrategia implica la sustitución del dominio de unión a receptor de tipo silvestre (RBD) de la envuelta con secuencias que codifican un anticuerpo de cadena única (scFv) frente a HER2 (proporcionado amablemente por los Drs. Michael Press y Jinha Park), (Figura 18). Se espera que esta modificación elimine la unión del vector a su receptor normal mientras que permite la unión directa a células tumorales que expresan HER2.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a la realización preferida, se debe entender que se pueden realizar diversas modificaciones. Por consiguiente, la invención solamente está limitada por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante que comprende:

5 una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína GAG retroviral;

una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína POL retroviral;

10 una secuencia de ácido nucleico que codifica una envuelta retroviral;

una secuencia polinucleotídica retroviral que comprende secuencias de Repetición Terminal Larga (LTR) en el extremo 5' y 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, donde una secuencia de promotor específico de tejido está contenida dentro de las secuencias LTR en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, siendo dicho promotor un promotor de un mamífero,

15 un casete que comprende un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) unido operativamente a un gen heterólogo, donde el casete se coloca justo cadena abajo de la secuencia que codifica la envuelta retroviral pero cadena arriba de la LTR 3'; y

20 secuencias de ácido nucleico que actúan en *cis* necesarias para la transcripción inversa, el empaquetamiento y la integración en una célula diana;

25 donde la secuencia polinucleotídica retroviral se obtiene de virus de leucemia murina (MLV), virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV) o virus de leucemia de gibón (GALV).

2. El oncorretrovirus de la reivindicación 1, en el que el MLV es un MLV anfotrópico.

3. Un oncorretrovirus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la envuelta retroviral comprende una proteína quimérica.

4. Un oncorretrovirus de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteína quimérica comprende una proteína ENV y un resto de dirección.

5. El oncorretrovirus de la reivindicación 4, en el que el resto de dirección es un anticuerpo, un receptor de hormonas o un ligando.

6. El oncorretrovirus de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el ligando es heregulina.

7. El oncorretrovirus de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única.

8. El oncorretrovirus de la reivindicación 4, en el que la proteína ENV se selecciona del grupo que consiste en proteína ENV de virus de leucemia murina (MLV) y proteína ENV de virus de necrosis esplénica (SNV).

9. El oncorretrovirus de la reivindicación 4, en el que la proteína ENV es una proteína anfotrópica.

10. El oncorretrovirus de la reivindicación 4, en el que la proteína ENV es una proteína ecotrópica.

11. El oncorretrovirus de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula que tiene un trastorno proliferativo de células.

12. El oncorretrovirus de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula neoplásica.

13. El oncorretrovirus de la reivindicación 11, en el que el trastorno proliferativo de células se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de tracto urinario, linfoma de cáncer uterino, cáncer oral, cáncer pancreático, leucemia, melanoma, cáncer de estómago y cáncer ovárico.

14. Un oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el promotor específico de tejido es el promotor de tipo silvestre.

15. El oncorretrovirus de la reivindicación 1, en el que la secuencia de promotor está asociada con un gen regulador del crecimiento.

16. El oncorretrovirus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de promotor específico de tejido comprende al menos un elemento de respuesta a andrógenos (ARE).

17. El oncorretrovirus de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el elemento de respuesta a andrógenos se obtiene del promotor de probasina.

ES 2 323 744 T3

18. El oncorretrovirus de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el promotor es el promotor de probasina.
19. Un polinucleótido de oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante, que comprende:
- 5 una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína GAG retroviral;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína POL retroviral;
- 10 una secuencia de ácido nucleico que codifica una envuelta retroviral;
- una secuencia polinucleotídica retroviral que comprende una Repetición Terminal Larga (LTR) en los extremos 5' y 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, donde una secuencia de promotor específico de tejido está contenida dentro de la LTR en el extremo 5' y/o 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, siendo dicho promotor un promotor de mamífero,
- 15 un casete que comprende un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) unido operativamente a un gen heterólogo, donde el casete se coloca justo cadena abajo de la secuencia que codifica la envuelta retroviral pero cadena arriba de la LTR 3'; y
- 20 una secuencia polinucleotídica que actúa en *cis* necesaria para la transcripción inversa, el empaquetamiento y la integración en una célula diana;
- donde las secuencias GAG, POL y de envuelta retroviral se obtienen de virus de leucemia murina (MLV), virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV) o virus de leucemia de gibón (GALV).
- 25 20. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el promotor es el promotor de probasina.
21. El polinucleótido de la reivindicación 19, en el que el MoMLV es un MoMLV anfotrópico.
- 30 22. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la envuelta retroviral comprende una proteína quimérica.
23. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 22, en el que la proteína quimérica comprende una proteína ENV y un resto de dirección.
- 35 24. El polinucleótido de la reivindicación 23, en el que en el que el resto de dirección es un anticuerpo, un receptor de hormonas o un ligando.
25. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el ligando es heregulina.
- 40 26. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única.
27. El polinucleótido de la reivindicación 23, en el que la proteína ENV se selecciona del grupo que consiste en proteína ENV de virus de leucemia murina (MLV) y proteína ENV de virus de necrosis esplénica (SNV).
- 45 28. El polinucleótido de la reivindicación 23, en el que la proteína ENV es una proteína anfotrópica.
29. El polinucleótido de la reivindicación 23, en el que la proteína ENV es una proteína ecotrópica.
- 50 30. Los polinucleótidos de la reivindicación 19, en los que la célula diana tiene un trastorno proliferativo de células.
31. El polinucleótido de la reivindicación 19, en el que la célula diana es una célula neoplásica.
32. El polinucleótido de la reivindicación 30, en el que el trastorno proliferativo de células se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de tracto urinario, linfoma de cáncer uterino, cáncer oral, cáncer pancreático, leucemia, melanoma, cáncer de estómago y cáncer de tiroides, cáncer de hígado y cáncer de cerebro y cáncer ovárico.
- 55 33. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el promotor específico de tejido es el promotor de tipo silvestre.
34. El polinucleótido de la reivindicación 19, en el que la secuencia de promotor está asociado con un gen regulador del crecimiento.
- 65 35. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la secuencia de promotor específico de tejido comprende al menos un elemento de respuesta a andrógenos (ARE).

ES 2 323 744 T3

36. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 35, en el que el elemento de respuesta a andrógenos se obtiene del promotor de probasina.

37. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 35, en el que el promotor es el promotor de probasina.

38. El polinucleótido de la reivindicación 19, en el que la secuencia polinucleotídica está contenida en una partícula viral.

39. El polinucleótido de la reivindicación 19, en el que la secuencia polinucleotídica está contenida en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40. Un oncorretrovirus con capacidad de replicación recombinante de acuerdo con la reivindicación 1:

en el que gen heterólogo es un gen suicida.

41. El oncorretrovirus de la reivindicación 40, en el que la envuelta retroviral comprende una proteína quimérica que comprende una proteína ENV y un resto de dirección y en el que la proteína ENV se selecciona del grupo que consiste en proteína ENV de virus de leucemia murina (MLV) y proteína ENV de virus de necrosis esplénica (SNV).

42. El oncorretrovirus de la reivindicación 40, en el que la envuelta retroviral comprende una proteína quimérica que comprende una proteína ENV y un resto de dirección y donde la proteína ENV es una proteína anfotrópica.

43. El oncorretrovirus de la reivindicación 40, en el que la envuelta retroviral comprende una proteína quimérica que comprende una proteína ENV y un resto de dirección y en el que la proteína ENV es una proteína ecotrópica.

44. El oncorretrovirus de la reivindicación 40, en el que el gen suicida es timidina quinasa o nucleósido purina fosforilasa (PNP).

Figura 1:

Estructura de retrovirus MLV (con capacidad de replicación) de tipo silvestre:

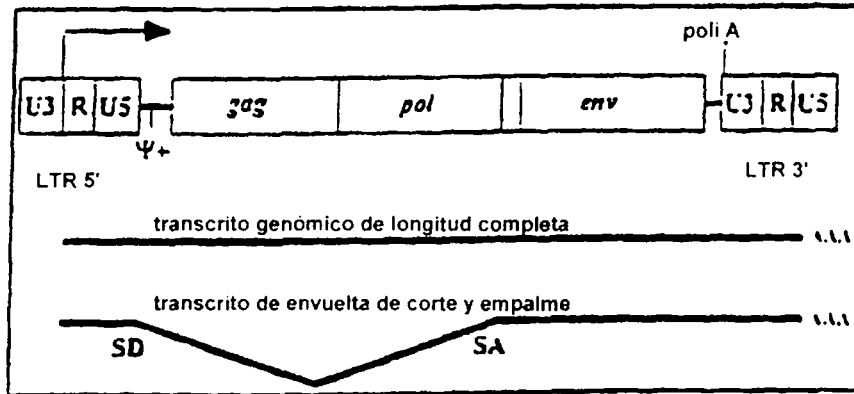
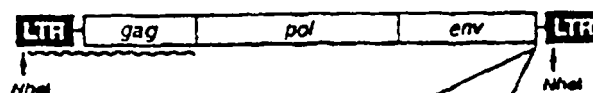


Figura 1B



Tamaño de inserto

5'LTR-GFP	1,3 kb	IRES GFP
5'LTR-higro	1,6 kb	IRES higro^R

5'LTR-GFP

<i>env</i>	IRES
...AGAGTACGAGCCATAGATAACGTTACTGGCC...	
IRES	GFP
...CAGGATAATACCATGGCCATTGGAACAAAGG...	
GFP	MLV no codificante
...CTGTACAAGTAGCGGCCGCCATAGATAAA...	

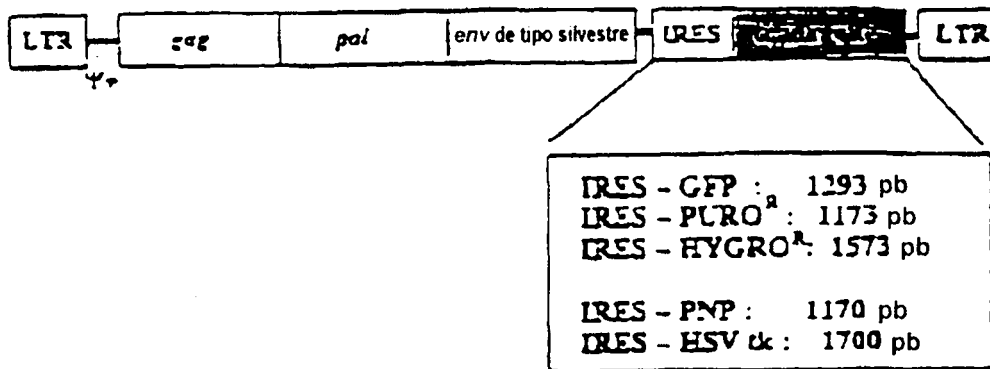
5'LTR-higro

<i>env</i>	IRES
...AGAGTACGAGCCATAGATAACGTTACTGGCC...	
IRES	higromicina ^R
...CAGGATAATACCATGGCCATTGGAACCGCGA...	
higromicina ^R	MLV no codificante
...TGGGGGCCGCCATAGATAAAAATAAAAGAT...	

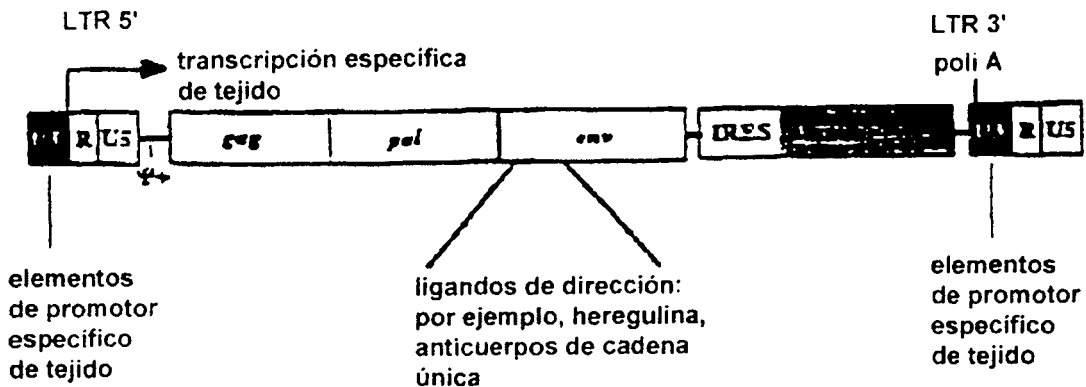
Figura 2:

a. Estructura de vectores retrovirales con capacidad de replicación (RCR) basados en MLV que contienen un casete de sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) - transgén:

1. No dirigido



b. Vectores retrovirales con capacidad de replicación (RCRV) dirigidos:



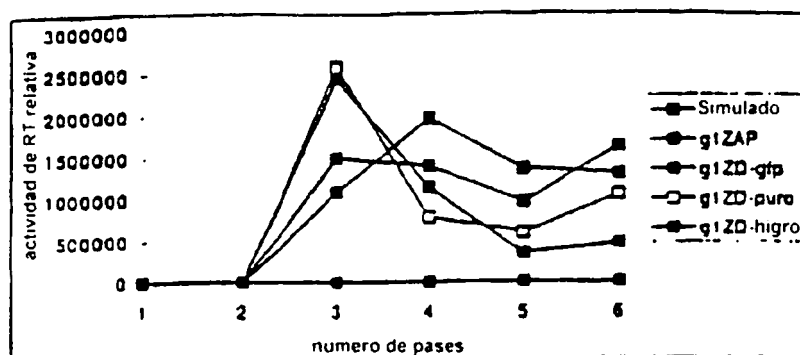


FIG. 3A

Leyenda

Simulado: control negativo no infectado

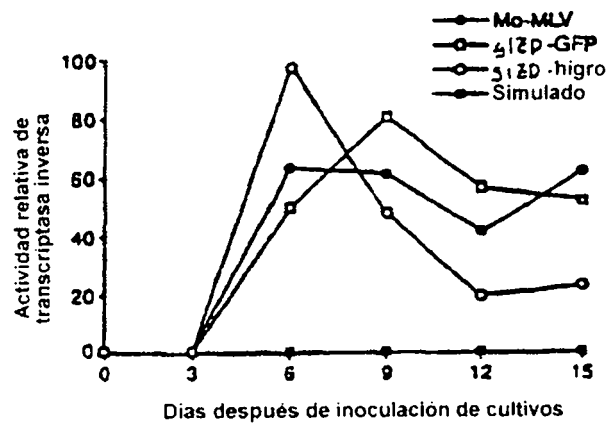
gIZAP: provirus de MLV con capacidad de replicación de tipo silvestre

gIZD-gfp: provirus MLV con capacidad de replicación con sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) en el extremo 3' del gen de envuelta, seguido del transgén de proteína verde fluorescente (GFP):

gIZD-puro: provirus MLV con capacidad de replicación con IRES en el extremo 3' del gen de envuelta, seguido del transgén de resistencia a puromicina (PURO^R)

gIZD-higro: provirus MLV con capacidad de replicación con IRES en el extremo 3' del gen de envuelta, seguido del transgén de resistencia a higromicina (HIGRO^R)

Logg y Kasahara, Figura 3B



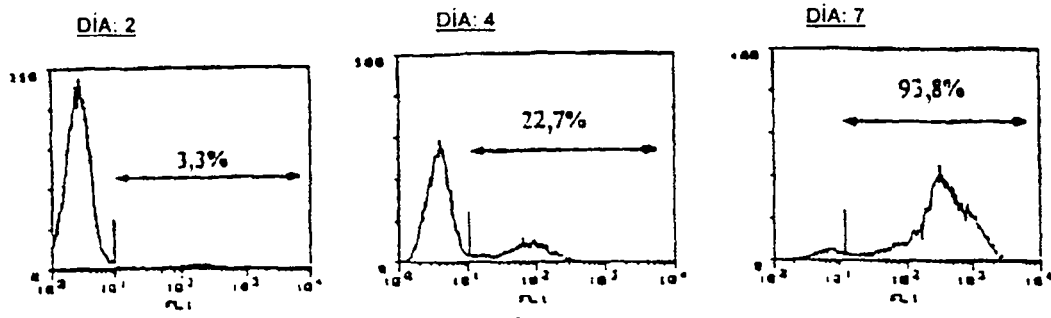
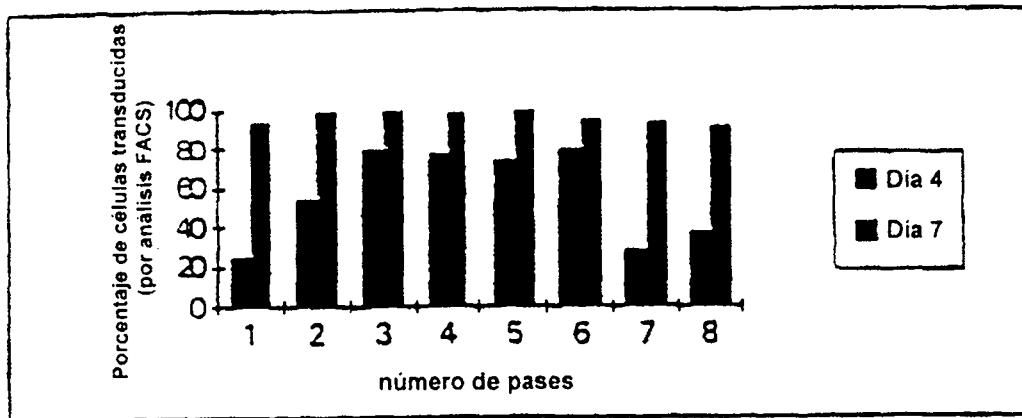
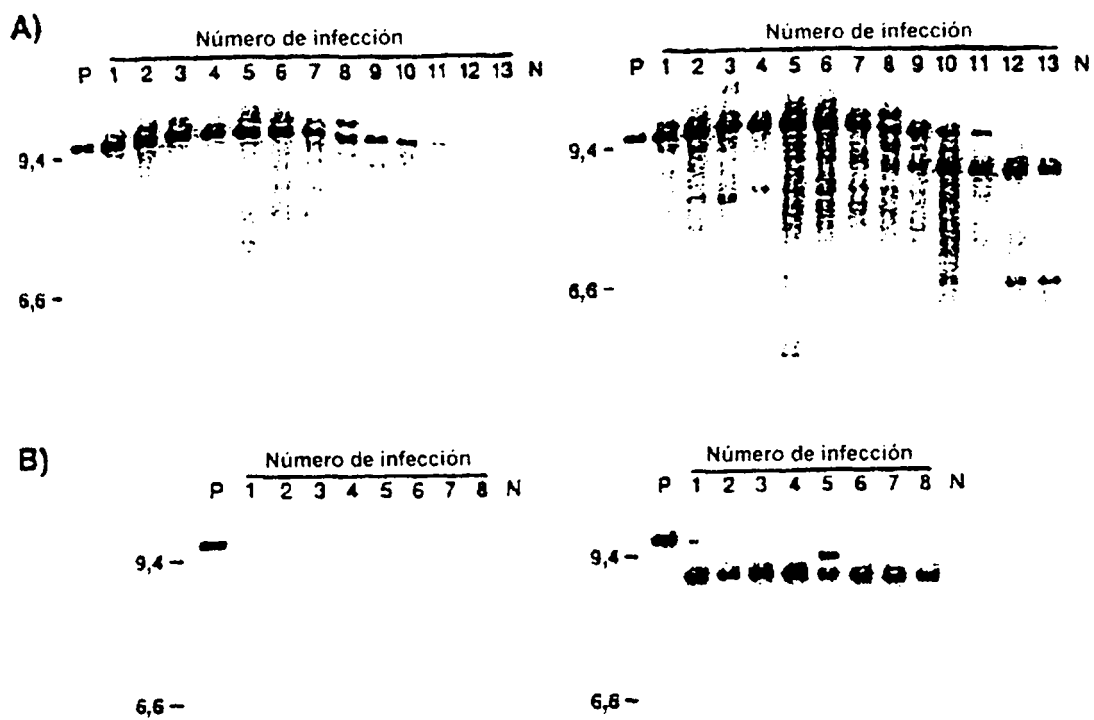


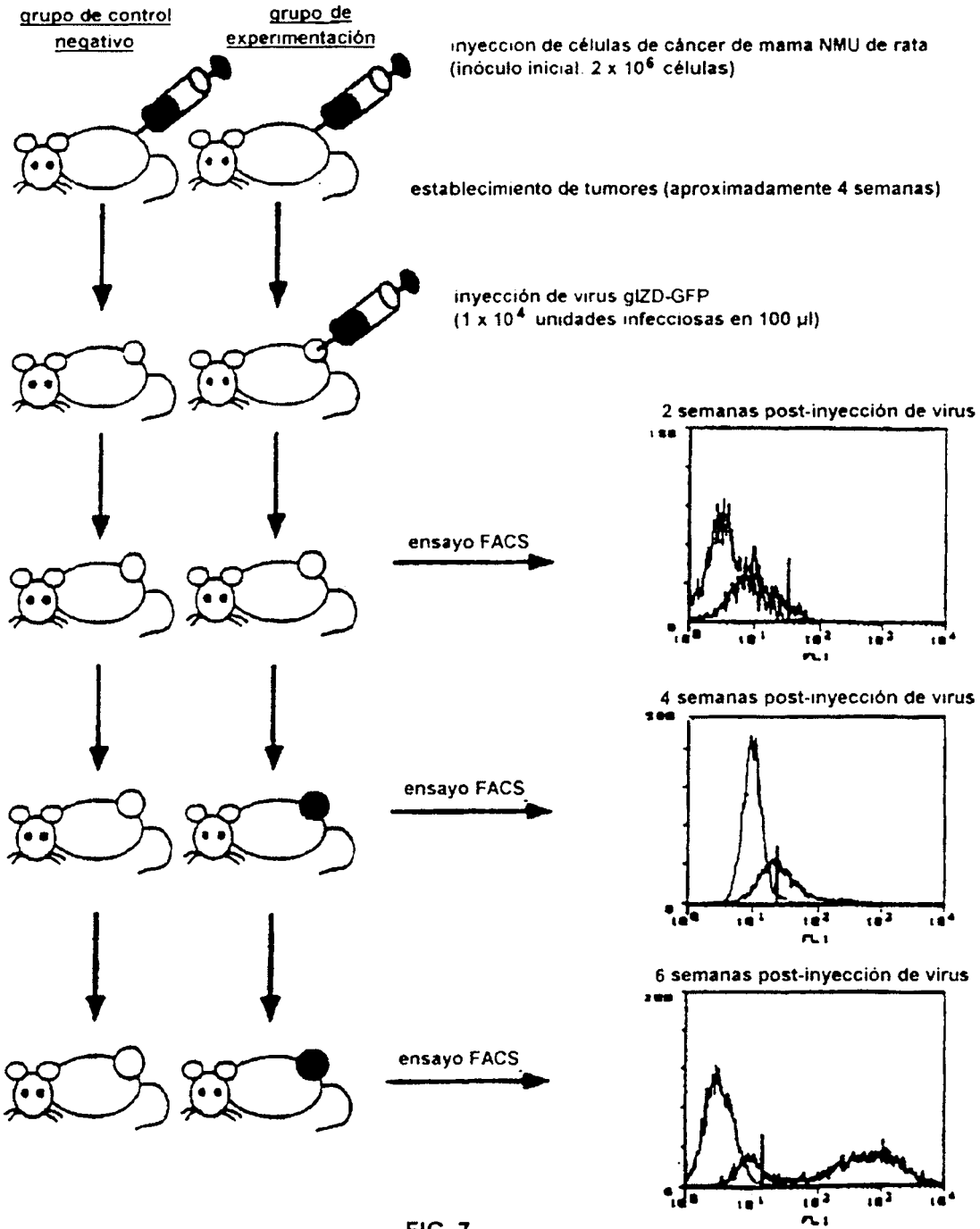
FIG. 5



Logg y Kasahara, Figura 6



(Análisis FACS: curva negra = tumor de control negativo, curva gris = tumor tratado con vector RCR)



(PP: promotor de probasina. LTR. Repetición terminal larga. ψ : señal de empaquetamiento)

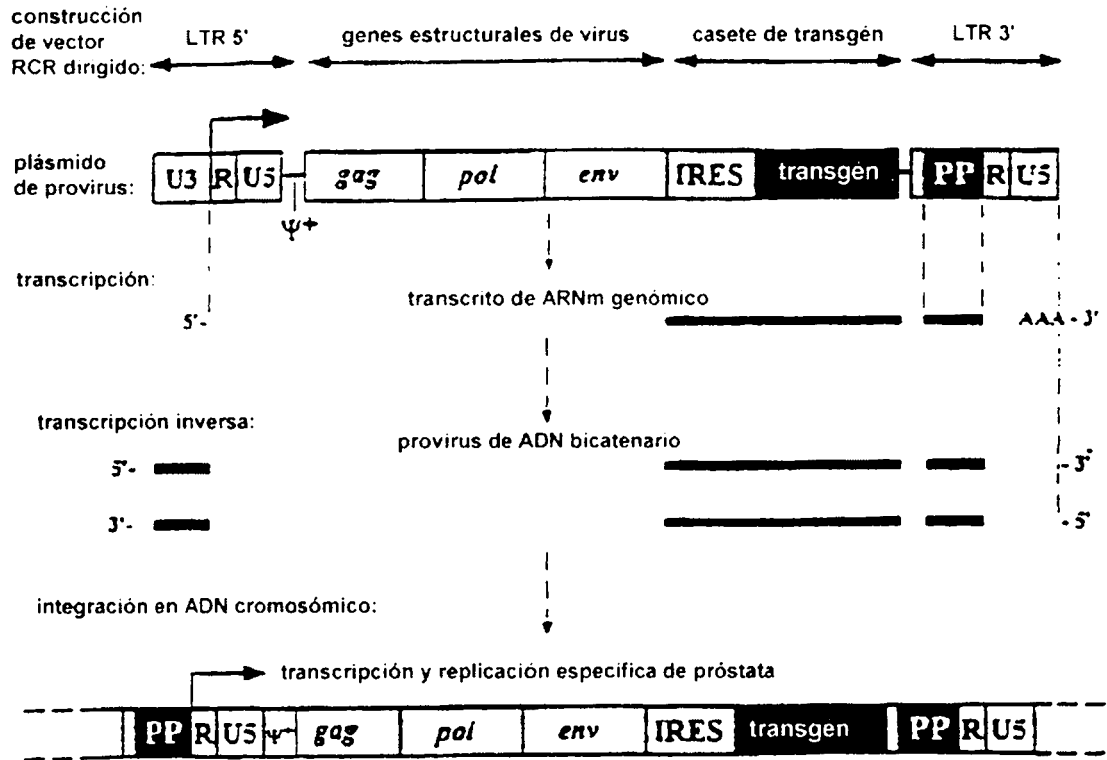
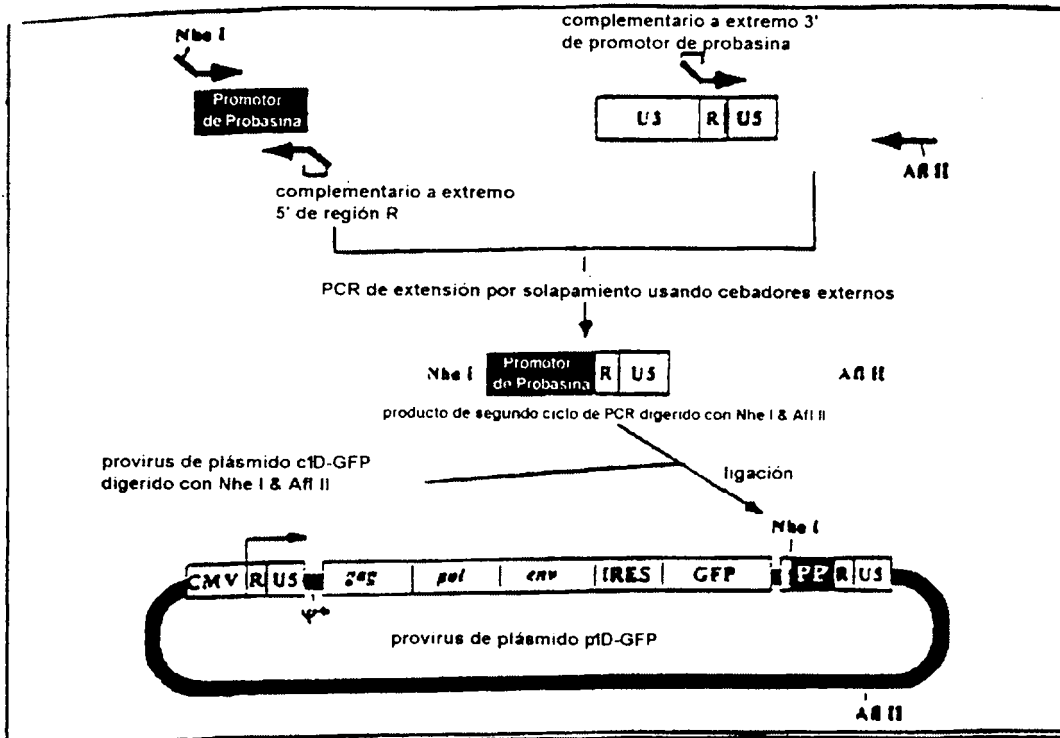
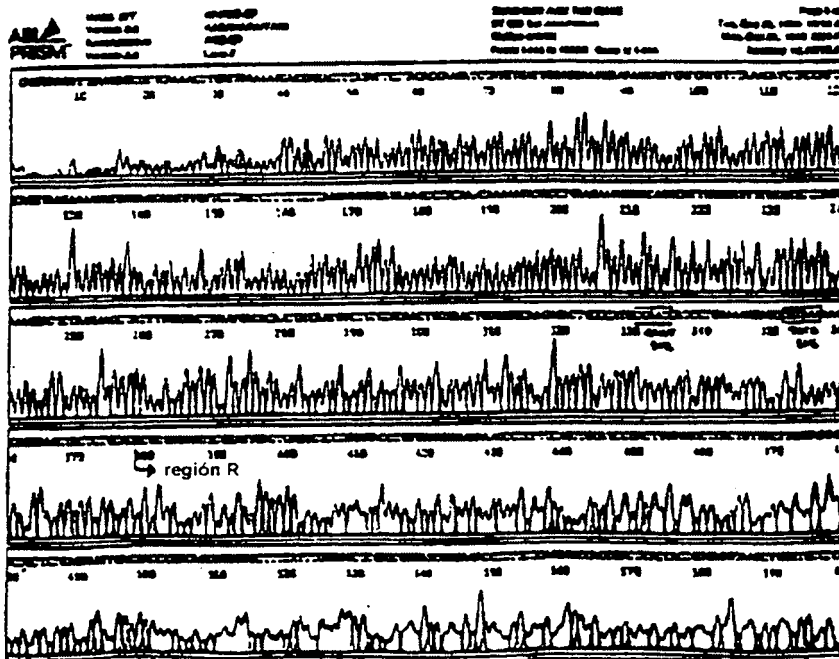
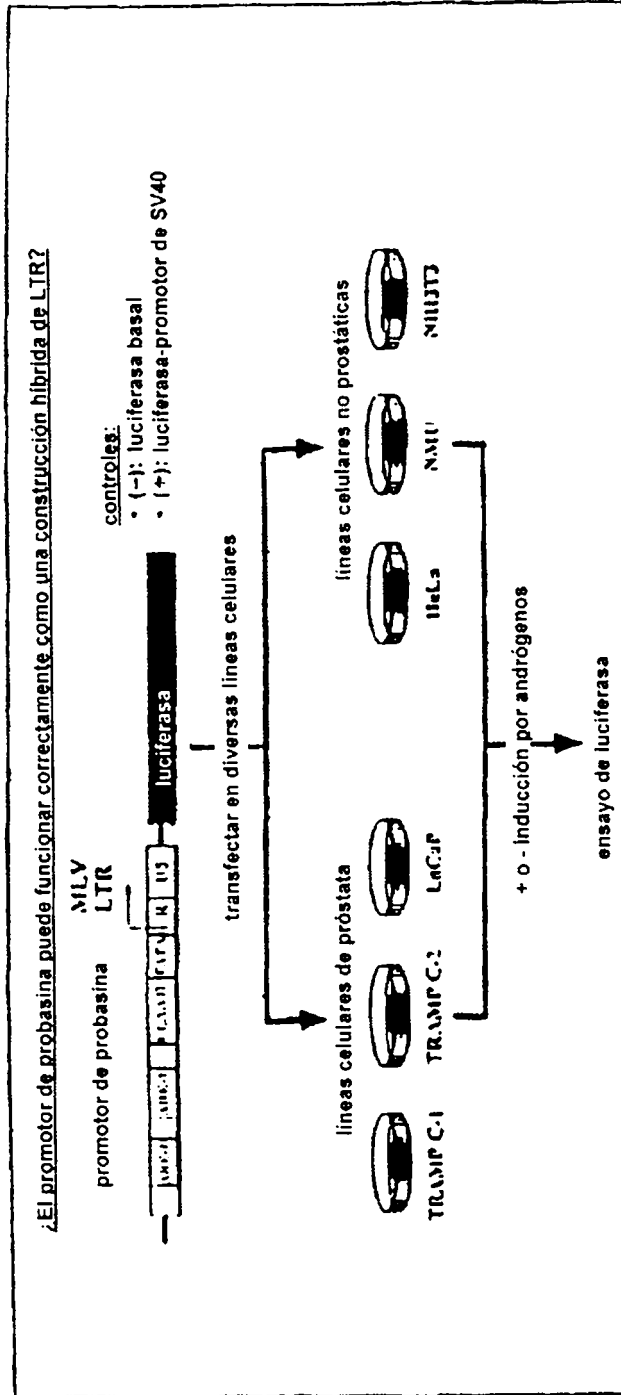


FIG. 8



Secuencia de unión de promotor de probasina-región R en LTR 3' de pTD-GFP:





ARE-1,2: elementos de respuesta a andrógenos, LTR de MLV: repetición terminal larga de virus de leucemia murina
 Líneas celulares de próstata: TRAMP C-1, C-2 (cáncer de próstata murino). LnCaP (cáncer de próstata humano)
 Líneas celulares no prostáticas: HeLa (cáncer de cuello de útero humano), NMU (cáncer de mama de rata). NIH3T3
 (fibroblasto de ratón)

FIG. 10

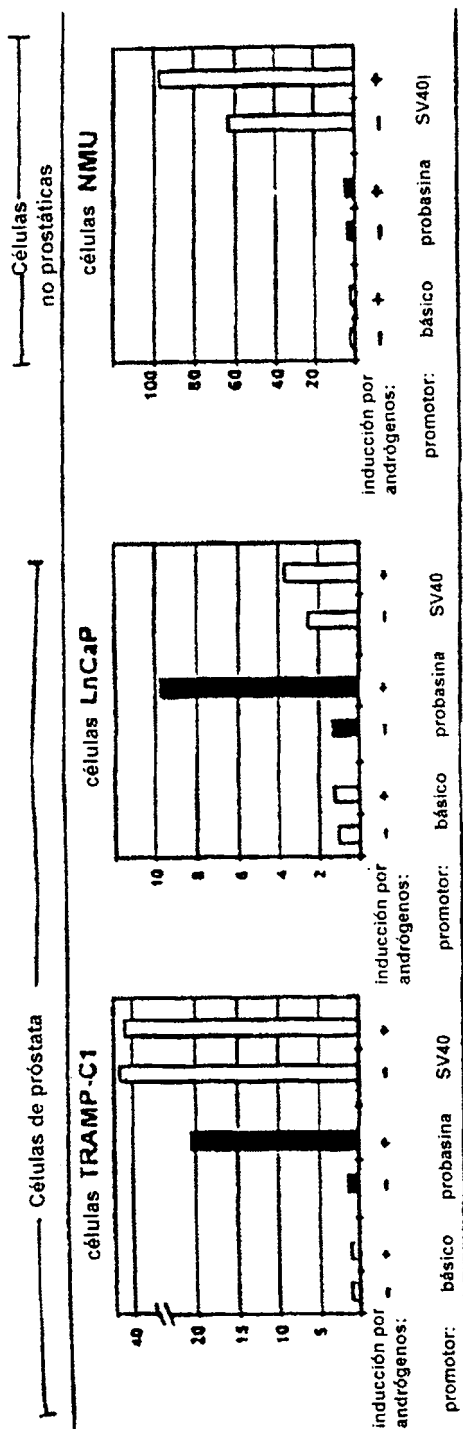


FIG. 11

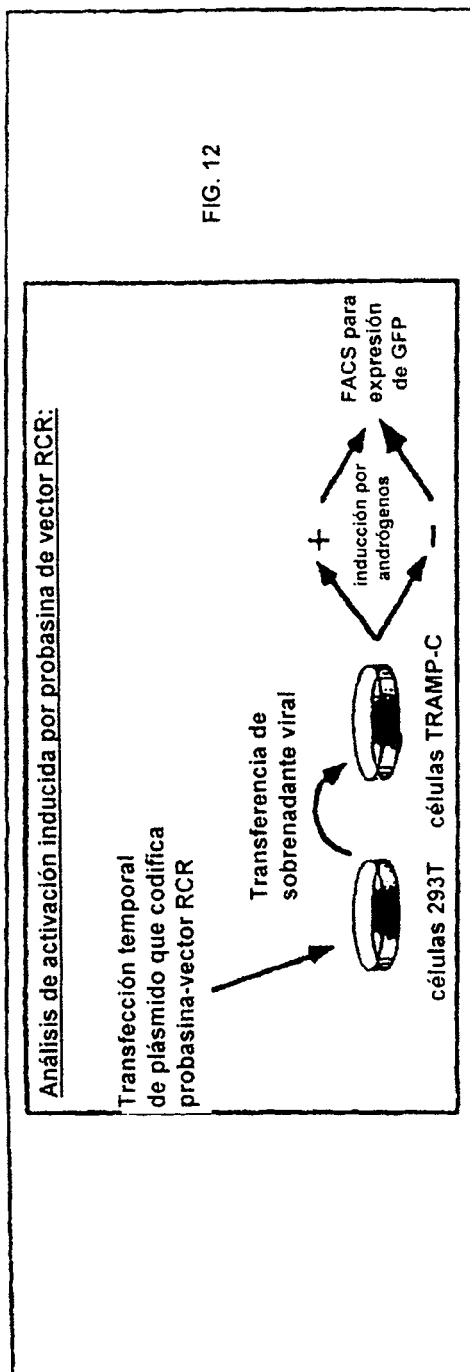
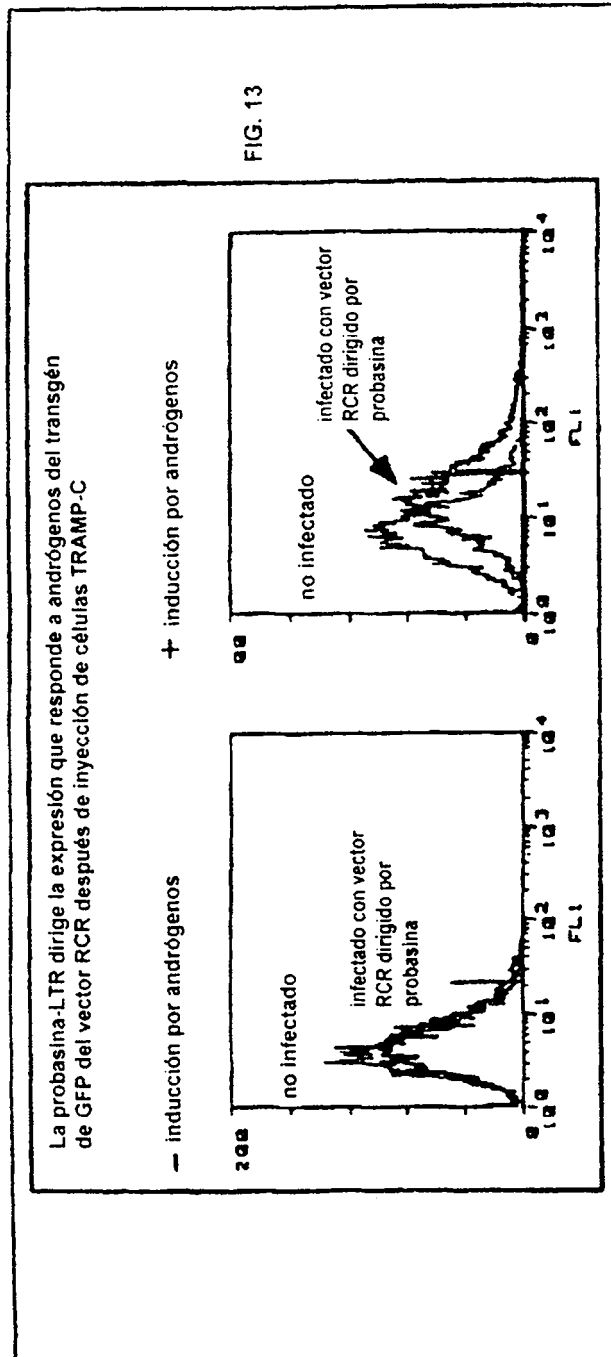


FIG. 12



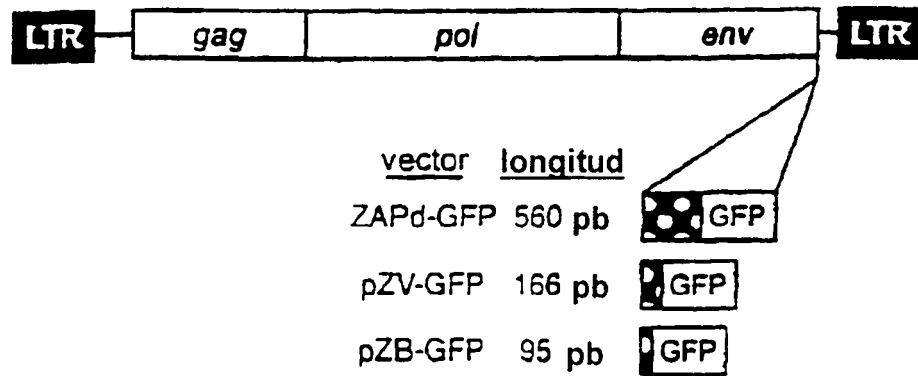


Figura 14. Estructura de vectores RCR con secuencias IRES más cortas

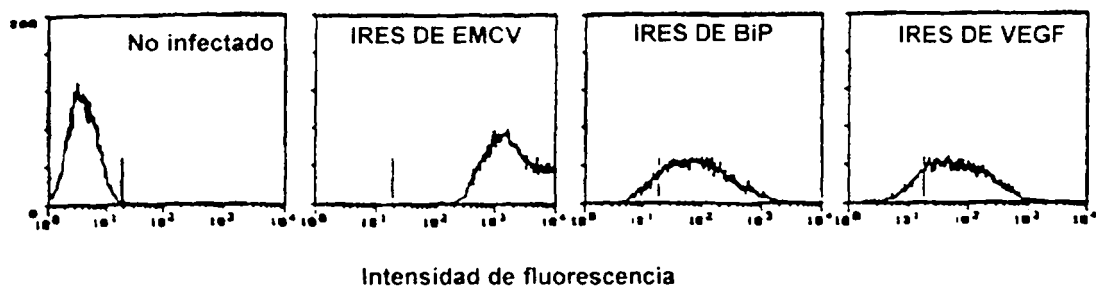


Figura 15. Comparación de niveles de expresión de GFP a células infectadas con vectores que utilizan tres secuencias IRES diferentes

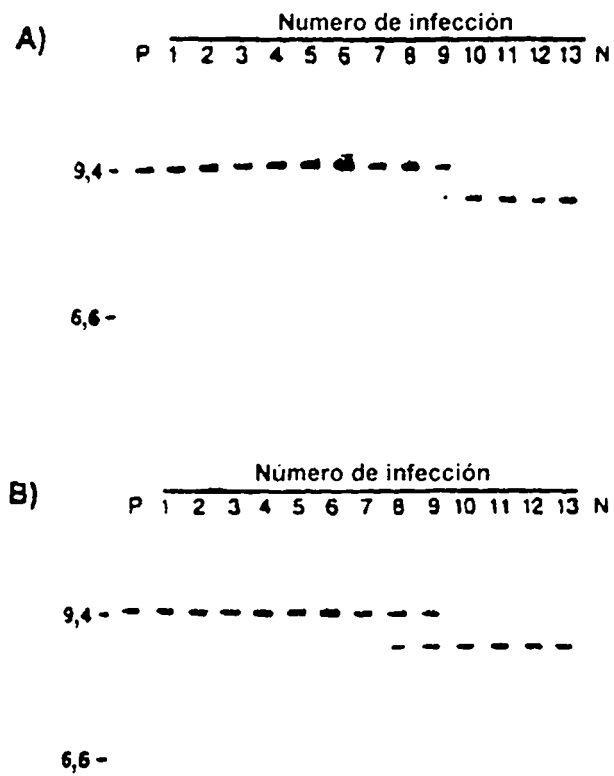
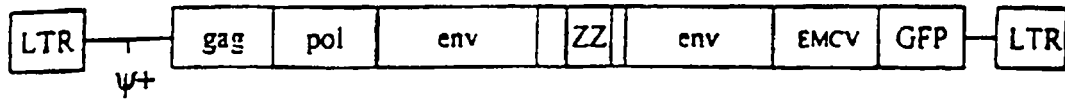


Figura 16. Análisis de transferencia de Southern de ADN proviral no integrado de células cultivadas infectadas de forma seriada con ZB-GFP (A) o ZV-GFP(B). Las sondas usadas fueron para la región LTR-gag de Mo-MLV.

ZE-GFP



ZV-A-GFP

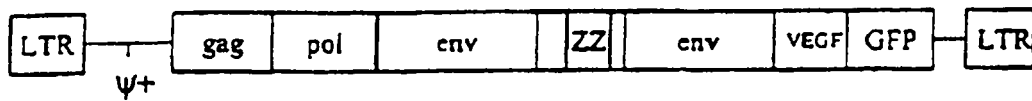
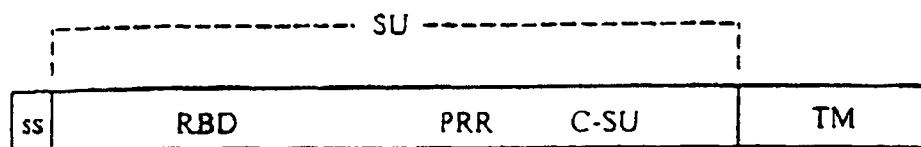


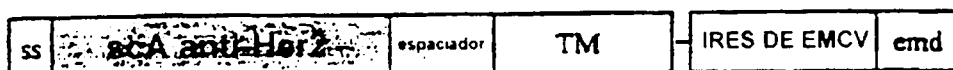
Figura 17. Vectores RCR dirigidos a dominio Z

Ambos vectores contienen dos copias en tándem del dominio Z de proteína A dentro de la PRR del gen de envuelta. En ZE-GFP, la traducción de GFP se dirige por el IRES DE EMCV y en ZV-A- GFP, por el IRES de VEGF.

Envuelta de MLV de tipo silvestre



ZDAH-emd



ZBAH-emd

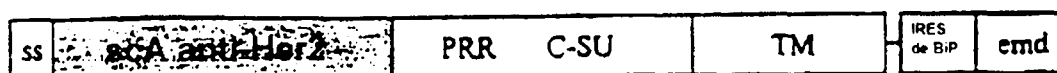


Figura 18. Estructura de envuelta de vectores RCR que contienen scFv anti-HER2.

ss. secuencia señal. SU: proteína de superficie. RBD: dominio de unión a receptor. PRR: región rica en prolina. C-SU: extremo C de SU. TM: proteína transmembrana. espaciador: un espaciador sintético de 6 aminoácidos.