(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 303 726**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **98914585 .9**
(86) Fecha de presentación : **08.04.1998**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0973538**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2000**

(54) Título: **Proteínas modificadas que se fijan a componentes de la matriz extracelular.**

(30) Prioridad: **10.04.1997 US 837223**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2008

(73) Titular/es: **University of Southern California**
3716 South Hope Street, Suite 313
Los Angeles, California 90033, US

(72) Inventor/es: **Hall, Frederick, L.;**
Gordon, Erlinda, Maria;
Anderson, W., French y
Starnes, Vaughn, A.

(74) Agente: **Gil Vega, Víctor**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Proteínas modificadas que se fijan a componentes de la matriz extracelular.

Esta invención se refiere a una proteína o a un polipéptido que es un polipéptido de la envoltura retroviral modificado. Esta invención se refiere además a partículas "diana" del vector retroviral. Más en particular, esta invención se refiere a partículas del vector retroviral, a polipéptidos modificados de la envoltura retroviral que incluyen un polipéptido diana incluyendo una región de unión que se fija a un componente de la matriz extracelular. El polipéptido diana puede estar situado entre dos residuos aminoácidos consecutivos de la proteína superficial viral, o puede sustituir residuos aminoácidos que han sido eliminados de la proteína superficial viral. El término "polipéptido" tal como se emplea aquí se refiere a un polímero de aminoácidos y no a longitud particular alguna del polímero. Este término incluye también proteínas o polipéptidos modificados post-traducción (por ejemplo glicosilados, acetilados, fosforilados, etc.)

Antecedentes de la invención

Las partículas de vectores retrovirales son agentes útiles para introducir polinucleótidos en las células, por ejemplo en células eucarióticas. El término "introducir" tal como se utiliza aquí abarca diversos métodos para transferir polinucleótidos a una célula, incluyendo estos métodos la transformación, transducción, transfección y transinfección.

Normalmente los retrovirus tienen tres marcos de lectura abiertos comunes, gag, pol y env, que codifican proteínas estructurales, enzimas, incluyendo la transcriptasa inversa, y proteínas de envoltura respectivamente. Típicamente, las partículas del vector retroviral son producidas mediante líneas celulares empaquetadas que proporcionan los productos genéticos necesarios gag, pol y env *in trans* (Miller y col., *Human Gene Therapy*, Vol. 1, páginas 5-14 (1990)). Esta aproximación resulta en la producción de partículas del vector retroviral que transducen las células de mamíferos, pero son incapaces de otra replicación después de haberse integrado en el genoma celular.

Así, se han utilizado partículas del vector retroviral para introducir polinucleótidos en células con el fin de una terapia genética. En una aproximación, se obtienen células de un paciente y se utilizan partículas del vector retroviral para introducir un polinucleótido deseado en ellas, y estas células modificadas son devueltas al paciente junto con las células manipuladas con propósitos terapéuticos. En otra aproximación, las partículas del vector retroviral se pueden administrar al paciente *in vivo*, con lo cual las partículas del vector retroviral transducen células del paciente *in vivo*.

Aunque las aplicaciones iniciales de la terapia genética humana se hayan realizado en sitios accesibles y en células diana que se manipulan fácilmente *ex vivo*, se prevé que los futuros protocolos de terapia genética describirán el suministro sistémico de vectores recombinantes para una amplia variedad de enfermedades cardiovasculares y otras (Ledley y col., *Molecular Genetics and Gene Therapy of Cardiovascular Disease*, Mockrin, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, páginas 467-485 (1995); Nabel, *Circulation*, Vol. 91, páginas 541-548 (1995)). El desarrollo de tecnologías asociadas a los tejidos diana ampliará mucho el alcance de la terapia genética en el campo cardiovascular y en otros campos de la medicina. La eficacia de los vectores retrovirales para ser suministrados genéticamente a tejidos cardiovasculares y otros está limitada por la ineficacia de la transferencia genética en el endotelio vascular intacto, por la inactivación de los vectores retrovirales *in vivo* y por la incapacidad de localizar concentraciones de vectores eficaces en sitios fisiológicos remotos. Así, la utilización de vectores retrovirales *in vivo* para su suministro genético a tejidos cardiovasculares y otros depende de la valoración viral efectiva, de la estabilidad, del acceso al tejido y de la capacidad para transducir células vasculares. Actualmente, el suministro selectivo de genes terapéuticos a la vasculatura dañada, enferma o transplantada sigue siendo el mayor reto en el desarrollo de los protocolos de terapia genética para las enfermedades cardiovasculares.

La WO-A-94/06920 se refiere a virus recombinantes que presentan un polipéptido no viral en su superficie externa.

La WO-A-96/30504 se refiere a una partícula del vector retroviral que tiene un polipéptido de envoltura modificado en la que una parte de la región de unión al receptor de la envoltura es sustituida por un polipéptido de acceso que se une a un ligando o a un receptor en las células seleccionadas.

La WO-A-96/31602 se refiere a una partícula proteinácea que comprende una cápside envuelta por las proteínas de envoltura del virus ecotrópico de la Leucemia Murina.

Sumario de la invención

La marcación de los vectores retrovirales se puede dividir en cuatro procesos individuales: (i) suministro de partículas virales concentradas; (ii) acoplamiento del virus a la célula diana; (iii) internalización del núcleo viral; y (iv) expresión del transgén deseado (Salmons y col., *Human Gene Therapy*, Vol. 4, páginas 129-141 (1993)). En contraste con las aproximaciones anteriores para conseguir el acceso al tejido mediante la construcción genética de la proteína de envoltura retroviral para incorporar los ligandos polipeptídicos a los receptores celulares (Kasahara y col., *Science*, Vol. 266, páginas 1373-1376 (1994); Valseria-Wittman y col., *J. Virol*., Vol. 68, páginas 4609-4619 (1994)) o los anticuerpos de una sola cadena que reconocen los antígenos específicos de las células (Russell, *Nucl. Acids Res*., Vol. 21, páginas 1081-1085 (1993); Cosset y col., *J. Virol*., Vol. 69, páginas 6314-6322 (1995); Somia y col., *Proc. Nat. Acad. Sci*., Vol. 92, páginas 7570-7574 (1995), la presente invención se enfoca en los vectores retrovirales diseñados para

utilizar la biología básica de curación de heridas para concentrar el suministro de genes terapéuticos en los lugares lesionados del tejido. Más en particular, la presente invención se dirige a las partículas de vector retroviral que tienen una proteína de superficie viral modificada, donde la proteína de superficie viral, que es un polipéptido de la envoltura retroviral, ha sido modificada para incluir un polipéptido de marcado que comprende una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular, gracias a lo cual el acceso de los vectores retrovirales a un componente de la matriz extracelular mejora la especificidad y/o la concentración local de los vectores. El término "componente de la matriz extracelular" tal como se utiliza aquí se refiere a una molécula que ocupa los espacios tisulares extracelulares.

Breve descripción de las figuras

A continuación se describe la invención con respecto a las figuras, en las que:

Figura 1A: esquema de la región de unión al receptor de la proteína ecotrópica gp70 (SEQ ID NO:1), mostrando la inserción de un polipéptido que incluye un dominio de unión a colágeno entre los residuos aminoácidos 18 y 19;

Figura 1B: esquema de la estructura de la envoltura y de la estrategia de clonación empleada para insertar un polipéptido de unión a colágeno flanqueado por los residuos aminoácido conector en el único lugar BstEII dentro de la región N-terminal de la proteína ecotrópica gp70;

Figura 2A: diagrama esquemático de la proteína de envoltura del virus de la Leucemia Murina de Moloney identificando los polipéptidos de superficie (SU) y transmembrana (TM), así como el péptido señal, el dominio auxiliar de unión a colágeno, la extensión de la membrana y regiones peptídicas R;

Figura 2B: muestra un SDS-PAGE demostrando la expresión, purificación y renaturalización de una proteína de envoltura quimérica que incluye un dominio de unión a colágeno;

Figura 2C: muestra la unión de la proteína de envoltura quimérica recombinante renaturalizada en pocillos microtitulados revestidos de colágeno;

Figura 3A: muestra células GPL Mock-transfectadas (control) (transfección con el vector vacío) que no muestran coloración positiva alguna para la proteína de envoltura gp70;

Figura 3B: muestra células GPL transfectadas con CEE+, que expresan la gp70 de tipo salvaje;

Figura 3C: muestra células GPL transfectadas con ADN del plásmido quimérico ECB-CEE+.

Figura 3D: Western Blot que muestra la comigración de la proteína de envoltura quimérica ECB-CEE+ con la proteína de envoltura de tipo salvaje CEE+, así como la comigración de las proteínas gag en la región de 30 kDa;

Figura 3E: muestra la unión selectiva de los virus quiméricos a las matrices de colágeno en pocillos microtitulados;

Figura 4A: muestra una placa de cultivo celular presentando una coloración positiva para la β-galactosidasa en cultivos transducidos con virus que portan la proteína de envoltura quimérica ECB-CEE+ y una coloración negativa en los cultivos transducidos con CEE+ de tipo salvaje y en cultivos no transducidos;

Figura 4B: muestra células NIH 3T3 en gran aumento expresando la β-galactosidasa después de la transducción mediante el vector unido a colágeno portador de la envoltura quimérica de ECB-CEE+;

Figura 4C: gráfico de la eficacia de transducción de los virus que portan la proteína quimérica ECB-CEE+ en presencia de suero humano normal;

Figura 5A: muestra un segmento lesionado con un catéter no tratado de aorta de ratón;

Figura 5B: gran aumento de una parte del segmento lesionado con el catéter mostrado en la Figura 5A;

Figura 5C: describe la unión de la proteína de envoltura quimérica ECB-CEE+ a un segmento lesionado de aorta de ratón;

Figura 5D: muestra la ausencia de unión de la proteína de envoltura quimérica ECB-CEE+ a un segmento no lesionado de aorta de ratón;

Figura 5E: muestra la unión de la proteína de envoltura quimérica ECB-CEE+ a un segmento de una vena cava inferior lesionada;

Figura 5F: muestra la transducción *in vivo* de condrocitos mediante un virus ECB-CEE+ tal como se muestra mediante la expresión de la β-galactosidasa nuclear seleccionada después de la inyección del sobrenadante del vector en la cola de un ratón recién nacido;

Figura 6A: muestra el aspecto global de un segmento de la arteria carótida común izquierda (diseccionada longitudinalmente) de una rata 9 días después de una lesión con catéter de balón y 2 días después de la instilación del sobrenadante del vector ECB-CEE+ (valoración: 8 x 10^5 cfu/ml). La zona entre corchetes muestra el lugar real de la lesión vascular y de la transducción *in vivo*. El segmento arterial a la derecha de la zona entre corchetes no estaba lesionado, pero estuvo expuesto al mismo vector. Se muestra un segmento corto de la arteria carótida derecha (abajo a la derecha) como control no lesionado no tratado;

Figura 6B: muestra a bajo aumento (10x) una sección longitudinal fijada con formalina de una arteria carótida común lesionada de rata después de tinción con X-gal. Se observan numerosas células (flechas) con núcleos de coloración azul a lo largo de la túnica media;

Figura 6C: gran aumento de un segmento de la pared arterial (zona entre corchetes en la Figura 6B) presentando células musculares lisas que expresan el transgén de β-galactosidasa marcado nuclearmente (las flechas apuntan hacia las células con núcleos azules prominentes);

Figura 7: Western Blot de lisatos celulares de células 293T infectadas con los vectores retrovirales CEE+, ECB-CEE+, CAE, ECB-CEE.CAE, o infectados con vector vacío (control);

Figura 8: muestra los resultados de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de células 293T infectadas con CEE+, ECB-CEE+, CAE, ECB-CEE+.CAE, o infectadas con vector vacío (control);

Figura 9: muestra los resultados de la clasificación celular activada por fluorescencia de células 293T y de células CH010 infectadas con CEE+, ECB-CEE+, CAE, ECB-CEE+.CAE, o infectadas con vector vacío (control);

Figura 10: muestra los resultados de un ensayo ELISA para la afinidad de unión a colágeno de los vectores CAE y ECB-CEE+.CAE;

Figura 11: muestra secciones de las arterias carótidas comunes izquierdas de ratones que fueron tratados con el vector retroviral CAE o con el vector retroviral ECB-CEE+.CAE;

Figura 12: muestra secciones de segmentos de vena safena humana lesionada tratados con CAE o ECB-CEE+.CAE; y

Figuras 13A y B: muestran placas ateroscleróticas humanas tratadas respectivamente con la proteína de envoltura quimérica SU-ECB-CEE+ o con un tampón (control).

Descripción detallada de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula de vector retroviral que tiene una proteína de superficie modificada viral, la cual es una proteína o un polipéptido de envoltura retroviral modificado, para marcar la partícula del vector un componente de la matriz extracelular. La proteína de superficie viral se modifica para incluir un polipéptido de marcado que incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular.

Las partículas del vector que tienen una proteína superficial modificada incluyen cualquier partícula del vector retroviral que pueda ser empleada para la transferencia génica a células *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* o para la terapia genética. El polipéptido de marcado puede estar colocado en cualquier región de cualquier proteína superficial viral. en una realización, el polipéptido marcador puede estar colocado entre dos residuos aminoácidos consecutivos de una proteína superficial viral. Alternativamente, se eliminan los residuos aminoácidos de una proteína superficial viral y se sustituyen por el polipéptido marcador.

En una realización, la partícula del vector viral es una partícula de vector retroviral. Se puede modificar cualquier parte de la envoltura retroviral para que incluya el polipéptido marcador. En una realización, se modifica la región de unión al receptor de la envoltura retroviral para incluir el polipéptido marcador.

En una realización, el polipéptido marcador se inserta entre dos residuos aminoácidos consecutivos numerados de la región de unión al receptor nativo (es decir, no modificado) de la envoltura retroviral. En otra realización, los residuos aminoácidos de la región de unión al receptor pueden ser eliminados y sustituidos por el polipéptido marcador. En una realización, antes de la modificación, la región de unión al receptor tiene la secuencia (SEQ ID NO:1), que es la región de unión al receptor de una envoltura retroviral ecotrópica. En el polipéptido de envoltura modificado, el polipéptido marcador se inserta entre los residuos aminoácidos 18 y 19 de la SEQ ID NO:1. En otra realización, en el polipéptido de envoltura modificado, el polipéptido marcador se inserta entre los residuos aminoácidos 6 y 7 de la SEQ ID NO:1.

El polipéptido (SEQ ID NO:1) es una parte de una proteína conocida como gp70, que está incluida en la envoltura ecotrópica del virus de la Leucemia Murina de Moloney. En general, la proteína gp70 incluye las regiones siguientes: (i) la señal secretora o secuencia "líder"; (ii) la región de unión al receptor; (iii) la región bisagra; y (iv) la parte del cuerpo. La SEQ ID NO:1 es la región de unión al receptor de la envoltura ecotrópica del virus de la Leucemia Murina de Moloney. Los solicitantes han descubierto que los retrovirus se pueden convertir en "accesibles" a un componente

de la matriz extracelular cuando la región de unión al receptor se modifica de tal modo que la región de unión al receptor incluya un polipéptido que se una a un componente de la matriz extracelular.

Como alternativa a la modificación de la región de unión al receptor, o además de la región de unión al receptor modificada, las partículas retrovirales pueden tener modificaciones en otras regiones de la proteína de envoltura con el fin de que otras regiones de la envoltura puedan incluir el polipéptido marcador, por ejemplo, la señal secretora o secuencia "líder", la región bisagra, o la parte del cuerpo. Estas modificaciones pueden incluir deleciones o sustituciones de residuos aminoácidos en la envoltura retroviral en la que los residuos aminoácidos procedentes de regiones distintas de la región de unión al receptor de la envoltura son eliminados y sustituidos por el polipéptido marcador, o el polipéptido marcador se sitúa entre residuos aminoácidos consecutivos numerados de regiones distintas a la región de unión al receptor de la envoltura viral.

En otra realización alternativa, la envoltura retroviral, antes de su modificación para incluir el polipéptido marcador que se une al componente de la matriz extracelular, puede ser una envoltura que incluya regiones de distintos tropismos. Por ejemplo, la envoltura retroviral puede ser una envoltura del virus de la Leucemia Murina de Moloney que incluye una proteína gp70 con una parte ecotrópica y una parte anfotrópica y/o xenotrópica.

En otra realización, la partícula retroviral del vector incluye una primera envoltura retroviral y una segunda envoltura retroviral. Cada una de las envolturas retrovirales primera y segunda incluye una proteína de superficie. La proteína de superficie incluye (i) una región de unión al receptor; (ii) una poliprolina hipervariable o región "bisagra"; y (iii) una parte del cuerpo. La región de unión al receptor, la región de poliprolina hipervariable y la parte del cuerpo se conservan en la primera envoltura retroviral que, en general, está libre de péptidos no retrovirales. En la segunda envoltura retroviral, se inserta un polipéptido marcador que incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular tal como se ha descrito anteriormente entre dos residuos aminoácidos contiguos de la proteína de superficie.

La primera envoltura retroviral puede ser una envoltura anfotrópica, una envoltura ecotrópica o una envoltura xenotrópica. Alternativamente, la primera envoltura retroviral puede incluir regiones de distintos tropismos. Por ejemplo, en una realización, la primera envoltura retroviral puede incluir una proteína de superficie que incluya (i) una región de unión al receptor ecotrópico; (ii) una región de poliprolina hipervariable anfotrópica; y (iii) una parte ecotrópica del cuerpo.

La segunda envoltura retroviral puede ser una envoltura anfotrópica, una envoltura ecotrópica o una envoltura xenotrópica, o una envoltura que tenga distintos tropismos, tal como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el polipéptido marcador se sitúa entre dos residuos aminoácidos consecutivos numerados de la región de unión al receptor de la envoltura retroviral. En una realización, la región de unión al receptor de la segunda envoltura retroviral tiene la secuencia SEQ ID NO:1, que es la región de unión al receptor de una envoltura retroviral ecotrópica tal como se ha descrito anteriormente. En la segunda envoltura retroviral, el polipéptido marcador se inserta entre los residuos aminoácidos 18 y 19 de la SEQ ID NO:1. En otra realización, en la segunda envoltura retroviral, el polipéptido marcador se inserta entre los residuos aminoácidos 6 y 7 de la SEQ ID NO:1.

Como alternativa a la inserción del polipéptido marcador en la región de unión al receptor de la segunda envoltura retroviral, se puede insertar el polipéptido marcador en otras regiones de la envoltura, tal como la región bisagra o la parte del cuerpo.

En general, el polipéptido marcador incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular, que es colágeno (incluyendo colágeno de Tipo I y colágeno de Tipo IV). Las regiones de unión que se pueden incluir en el polipéptido marcador comprenden, pero no se limitan a, dominios polipeptídicos que son dominios funcionales dentro del Factor von Willebrand o derivados del mismo en las que estos dominios polipeptídicos se unen al colágeno. En una realización, la región de unión es un polipéptido que tiene la siguiente fórmula estructural: Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Ser (SEQ ID NO:3).

Otras regiones de unión que pueden estar incluidas en la envoltura viral comprenden, pero no se limitan a, arginina-glicina-ácido aspártico, o RGD, secuencia que se une a la fibronectina, y un polipéptido que tiene la secuencia Gly-Gly-Trp-Ser-His-Trp, que se une también a la fibronectina.

Además de la región de unión, el polipéptido marcador además puede incluir las secuencias conectoras de uno o más residuos aminoácidos situados en el N-terminal y/o en el C-terminal de la región de unión, con lo cual estos conectores aumentan la flexibilidad de rotación y/o minimizan el impedimento estérico del polipéptido de envoltura modificado.

Se debe entender, sin embargo, que el alcance de la presente invención no se debe limitar a ningún polipéptido marcador o región de unión específicos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido modificado que codifica una proteína de superficie viral modificada para dirigir un vector hacia un componente de la matriz extracelular. Este polinucleótido incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador que incluye una región de unión que se

une a un componente de la matriz extracelular. El vector y la proteína superficial viral modificada pueden seleccionarse de entre aquellos descritos anteriormente.

En una realización, el vector es un vector retroviral y la proteína de superficie viral modificada es un polipéptido de envoltura retroviral modificado. El polipéptido de envoltura incluye una región de unión al receptor. En una realización, en el polinucleótido modificado, se modifica el polinucleótido que codifica la región de unión al receptor para que incluya un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador que incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular.

En una realización, antes de la modificación, el polinucleótido que codifica la región de unión al receptor codifica una región de unión al receptor que tiene la secuencia SEQ ID NO:1. En el polinucleótido modificado, el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador se inserta entre el codón que codifica el residuo aminoácido 18 y el codón que codifica el residuo aminoácido 19 de la SEQ ID NO:1. En otra realización, en el polinucleótido modificado, el polinucleótido que codifica el polipéptido marcador se inserta entre el codón que codifica el residuo aminoácido 6 y el codón que codifica el residuo aminoácido 7 de la SEQ ID NO:1. La región de unión al receptor que tiene la secuencia SEQ ID NO:1 es codificada por el polinucleótido que tiene la SEQ ID NO:2 o por un derivado o análogo del mismo.

El término "derivado o análogo del mismo" tal como se utiliza aquí significa que el polinucleótido que codifica el polipéptido (SEQ ID NO:1) puede tener una secuencia distinta del polinucleótido con (SEQ ID NO:2), aunque codifiquen el mismo polipéptido. Estas diferencias en las secuencias de los polinucleótidos pueden deberse, por ejemplo, a la degeneración del código genético. Se contempla también dentro del alcance de la presente invención que, antes de la modificación de la SEQ ID NO:2 con un polinucleótido que codifica un polipéptido marcador, la SEQ ID NO:2 se puede modificar de forma que uno o más codones cambien con el fin de modificar residuos aminoácidos distintos de las secuencias no modificadas. Estas modificaciones pueden facilitar la inserción del polinucleótido que codifica el polipéptido marcador.

Los polinucleótidos anteriores se pueden construir mediante técnicas de ingeniería genética conocidas por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, se puede construir un primer plásmido de expresión que incluya un polinucleótido que codifica la envoltura no modificada. Luego se construye el plásmido para que un polinucleótido que codifica el polipéptido marcador se inserte entre dos codones que codifican consecutivamente los residuos aminoácidos enumerados de la envoltura no modificada, o se construye para que un polinucleótido que codifica una parte de la envoltura no modificada se elimine, con lo cual esta parte puede ser sustituida por un polinucleótido que codifica el polipéptido marcador. El polinucleótido que codifica el polipéptido marcador puede estar contenido en un segundo plásmido de expresión o puede existir como secuencia de polinucleótido desnudo. El polinucleótido que codifica el polipéptido marcador o el plásmido que contiene este polinucleótido se corta en los lugares apropiados de la enzima de restricción y se clona en el primer plásmido de expresión, que también ha sido cortado en los lugares apropiados de la enzima de restricción. Por tanto, el plásmido de expresión resultante incluye un polinucleótido que codifica la proteína de envoltura modificada. Entonces este polinucleótido se puede clonar fuera del plásmido de expresión y dentro de un vector retroviral plásmido. El vector retroviral plásmido resultante, que incluye el polinucleótido que codifica la proteína de envoltura modificada y que puede incluir también un polinucleótido que codifica una proteína o un péptido heterólogo, es transfectado dentro de una línea celular empaquetadora apropiada para formar una línea celular productora que genere partículas retrovirales del vector que incluyen la proteína de envoltura modificada. Alternativamente, una secuencia de polinucleótido desnudo que codifica la proteína de envoltura modificada se transfecta dentro de una línea celular "pre-empaquetadora" que incluye secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas gag y pol, formando así una línea celular empaquetadora, o se transfecta dentro de una línea celular empaquetadora que incluye secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas gag, pol y env de tipo salvaje (es decir, no modificadas), formando así una línea celular empaquetadora que incluye secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína env de tipo salvaje así como la proteína de envoltura modificada. Entonces estas células empaquetadoras pueden ser transfectadas con un vector retroviral plásmido, que puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o un péptido heterólogo, formando así una línea celular productora para generar partículas del vector retrovirales que incluyen la proteína de envoltura modificada. Por tanto, este polinucleótido puede estar contenido en la partícula de vector retroviral anteriormente mencionada o en una célula productora para generar la partícula del vector retroviral anteriormente mencionada.

El término "polinucleótido" tal como se utiliza aquí alude a una o más formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos. Este término incluye también ADN de una sola hebra y de doble hebra, así como ARN de una sola hebra y de doble hebra. El término incluye también polinucleótidos modificados, tales como polinucleótidos metilados o cubiertos.

En una realización preferente, la partícula del vector que tiene una envoltura modificada de acuerdo con la invención incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo que se va a expresar en una célula deseada. En una realización, el polipéptido heterólogo puede ser un agente terapéutico. El término "terapéutico" se utiliza en un sentido genérico e incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos y agentes de sustitución.

Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a, agentes de control del ciclo celular, agentes que inhiben proteínas ciclinas tales como los polinucleótidos antisentido a los genes ciclina G1 y ciclina D1, factores de crecimiento, por ejemplo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, TGF-α, TGF-β, y factor de crecimiento de fibroblastos, citoquinas,

incluyendo sin limitación las iInterleuquinas 1 a 13, y factores de necrosis tumoral, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, agentes antiinflamatorios, proteínas supresoras de tumores, factores de coagulación, incluidos el Factor VIII y el Factor IX, proteína S, proteína C, antitrombina III, Factor von Willebrand, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y marcadores selectivos negativos tales como la timidina quinasa del virus Herpes Simplex.

Se debe entender, sin embargo, que el alcance de la presente invención no se debe limitar a ningún agente terapéutico en particular.

El polinucleótido que codifica el agente terapéutico está bajo el control de un promotor adecuado. Promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, LTR retroviral, el promotor SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus del Sarcoma de Rous (RSV), el promotor de histonas, el promotor polIII, el promotor β-actina, promotores inducibles tales como el promotor de MMTV, el promotor de metalotioneína, promotores de choques térmicos, promotores de adenovirus, promotor de albúmina, promotor de ApoAI, promotores del parvovirus B19, promotores de globina humana; promotores de timidina quinasa virales tales como el promotor de timidina quinasa del virus Herpes Simplex, LTRs retrovirales, promotores de la hormona de crecimiento humana y el promotor inducible de MxIFN. El promotor puede ser también el promotor nativo que controla el polinucleótido que codifica el agente terapéutico. Se debe entender, sin embargo, que el alcance de la presente invención no debe limitarse a los genes o promotores extraños específicos.

Los polinucleótidos que codifican el polipéptido de envoltura modificado y el agente terapéutico se pueden colocar en un vector apropiado mediante técnicas de ingeniería genética conocidas por los especialistas en la técnica. Cuando el vector modificado es una partícula del vector retroviral, los polinucleótidos que codifican el polipéptido de envoltura modificado y el agente terapéutico se colocan en un vector retroviral plásmido adecuado.

En una realización, el vector retroviral plásmido puede derivarse del virus de la Leucemia Murina de Moloney y pertenece a la serie LN de vectores, tales como los que han sido descritos anteriormente, y descritos además en Bender y col., *J. Virol*., Vol. 61, páginas 1639-1649 (1987) y Miller y col., *Biotechniques*, Vol. 7, páginas 980-990 (1989). Estos vectores tienen una parte de la señal empaquetadora derivada de un virus de sarcoma de ratón y un codón de iniciación gag mutado. El término "mutado" tal como se utiliza aquí significa que el codón de iniciación gag se ha eliminado o alterado para que la proteína gag, o fragmentos o truncamientos de la misma, no se expresen.

En otra realización, el vector retroviral plásmido puede incluir al menos cuatro lugares de reconocimiento de la enzima de restricción o de clonación, en los que al menos dos de los lugares tienen una frecuencia media de aparición en los genes eucarióticos de menos de una vez en 10.000 pares de bases; es decir, el producto de restricción tiene un tamaño medio de ADN de al menos 10.000 pares de bases. Se seleccionan los lugares preferentes de clonación de entre el grupo compuesto por NotI, SnaBI, SalI y XhoI. En una realización preferente, el vector retroviral plásmido incluye cada uno de estos lugares de clonación. Se describen además estos vectores en la Patente de Estados Unidos Nº 5.672.510.

Cuando se emplea un vector retroviral plásmido que incluye estos lugares de clonación, también se puede proporcionar un vector de clonación lanzadera que incluye al menos dos lugares de clonación que son compatibles con al menos dos lugares de clonación seleccionados de entre el grupo compuesto por NotI, SnaBI, SalI y XhoI localizados en el vector retroviral plásmido. El vector de clonación lanzadera incluye también al menos un polinucleótido deseado que codifica un agente terapéutico que es capaz de ser transferido desde el vector de clonación lanzadera al vector retroviral plásmido.

El vector de clonación lanzadera se puede construir a partir de un vector o fragmento básico del "esqueleto" al que están ligados uno o más conectores que incluyen los lugares de reconocimiento de la enzima de clonación o de restricción. Están incluidos entre los lugares de clonación los lugares de clonación compatibles o complementarios descritos anteriormente. Los genes y/o promotores que tienen extremos que se corresponden con los lugares de restricción del vector lanzadera pueden estar ligados dentro del vector lanzadera por medio de técnicas conocidas.

El vector de clonación lanzadera se puede emplear para amplificar las secuencias de ADN en sistemas procarióticos. El vector de clonación lanzadera se puede preparar a partir de los plásmidos habitualmente utilizados en los sistemas procarióticos y en particular en bacterias. Así, por ejemplo, el vector de clonación lanzadera puede proceder de plásmidos tales como pBR322, pUC 18, etc.

El vector retroviral plásmido incluye uno o más promotores. Promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, LTR retroviral; el promotor de SV40; y el promotor del citomegalovirus humano (CMV) descritos en Miller y col., *Biotechniques*, Vol. 7, No. 9, 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (por ejemplo, promotores celulares tales como los promotores celulares eucarióticos, que incluyen, pero no se limitan a, promotores de histona, pol III y β-actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, promotores de adenovirus, promotores de TK y promotores del parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado se hará evidente para los especialistas en la técnica a partir de las enseñanzas contenidas aquí.

En una realización, el vector retroviral plásmido, que incluye un polinucleótido que codifica la envoltura modificada y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, se emplea para transducir una línea celular empaquetadora

para formar una línea celular productora, que generará partículas del vector retrovirales infecciosas. En una realización, la línea celular empaquetadora es una línea celular "pre-empaquetadora" que incluye polinucleótidos que codifican las proteínas retrovirales gag y pol, pero no la envoltura o la proteína env. Ejemplos de estas líneas celulares "pre-empaquetadoras" incluyen, pero no se limitan a, células GP8, células GPL y células GPNZ, tal como se describe en Morgan y col., *J. Virol*., Vol. 67, No. 8, páginas 4712-4721 (agosto de 1993). Estas líneas celulares, a su transducción con el vector retroviral plásmido, generan partículas retrovirales infecciosas que incluyen la envoltura modificada o quimérica y un polinucleótido que codifica el agente terapéutico.

En otra realización, un vector retroviral plásmido que incluye un polinucleótido que codifica un polinucleótido modificado codificador de un polipéptido de envoltura modificado según la invención y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico se utiliza para transducir una línea celular empaquetadora que incluye secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas retrovirales gag, pol y env de tipo salvaje (es decir no modificada). Ejemplos de estas líneas celulares empaquetadoras incluyen, pero no se limitan a, las líneas celulares PE501, PA317 (ATCC No. CRL 9078), Ψ-2, Ψ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ΨCRE, ΨCRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN, tal como se describe en Miller, *Human Gene Therapy*, Vol. 1, páginas 5-14 (1990), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. El vector puede transducir las células empaquetadoras mediante cualquier medio conocido en la técnica. Estos medios incluyen, pero no se limitan a, la electroporación y la utilización de liposomas, tales como aquellos descritos anteriormente, así como precipitación de $CaPO_4$. Estas células productoras generan partículas del vector retrovirales infecciosas que incluyen la envoltura modificada, la envoltura retroviral de tipo salvaje, un polinucleótido que codifica la envoltura modificada, o quimérica y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico.

En otra realización, se proporciona una célula empaquetadora que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una envoltura quimérica modificada de acuerdo con la invención y que puede incluir además secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas gag y pol. Se obtiene una célula productora para generar partículas virales que incluye una envoltura modificada de acuerdo con la invención mediante la introducción de esta célula empaquetadora de una partícula del vector retroviral o de un vector retroviral plásmido, incluyendo en cada caso un polinucleótido que codifica un agente terapéutico. Por tanto, la línea celular productora genera partículas retrovirales infecciosas que incluyen la envoltura quimérica modificada y el polinucleótido que codifica el agente terapéutico.

Cuando la partícula del vector retroviral incluye las envolturas retrovirales primera y segunda, tal como se ha descrito anteriormente, esta partícula se puede obtener mediante transducción de una línea celular empaquetadora, tal como se ha descrito aquí anteriormente, con un vector retroviral plásmido que incluye un polinucleótido que codifica la segunda envoltura retroviral y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico. La línea celular empaquetadora se convierte así en una línea celular productora que genera partículas del vector retrovirales incluyendo la primera y segunda envolturas retrovirales, y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico. Alternativamente, una línea celular pre-empaquetadora puede ser transfectada con un vehículo de expresión que incluye un polinucleótido que codifica la primera envoltura retroviral y un vector retroviral plásmido que incluye un polinucleótido que codifica la segunda envoltura retroviral, así como un polinucleótido que codifica un agente terapéutico. Entonces estas células generan partículas del vector retrovirales que tienen la primera y segunda envolturas retrovirales, tal como se ha descrito aquí anteriormente, y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico.

Las partículas del vector, que incluyen la envoltura retroviral modificada y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, pueden ser administradas a un huésped en una cantidad eficaz para producir un efecto terapéutico en él. El huésped puede ser un huésped mamífero, humano o primate no humano. Las partículas del vector, a su administración al huésped, se concentran en un lugar de un componente expuesto de la matriz, que es colágeno (incluidos colágeno de Tipo I y colágeno de Tipo IV), con lo cual las partículas del vector virales infectan o transducen las células en este lugar del componente expuesto de la matriz extracelular, y las células infectadas o transducidas expresan el agente terapéutico *in vivo*. La dosificación exacta de las partículas del vector que se pueden administrar depende de diversos factores, incluyendo la edad, el sexo y el peso del paciente, las células que han de ser transducidas, el agente terapéutico que ha de ser administrado y la gravedad del trastorno a tratar.

Las partículas del vector se pueden administrar sistémicamente, por ejemplo mediante administración intravenosa, intracolónica, intratraqueal, intraperitoneal, intranasal, intravascular, intratecal, intraarterial, intracraneal, intramedular, intrapleural, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraocular, intraósea y/o intrasinovial. Las partículas del vector se pueden administrar también tópicamente.

Las células que pueden ser infectadas o transducidas con las partículas del vector de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células endoteliales, células tumorales, condrocitos, fibroblastos y células fibroelásticas de los tejidos conectivos; osteocitos y osteoblastos del hueso; células endoteliales y musculares lisas de la vasculatura; células epiteliales y subepiteliales de los tractos gastrointestinales y respiratorios; células vasculares, células de tejido conectivo y hepatocitos de un hígado fibrótico, así como infiltrados granulocíticos y mononucleares reparativos de los tejidos inflamados.

Las enfermedades o trastornos que se pueden tratar con las partículas del vector de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos asociados a un componente expuesto de la matriz extracelular. Estas enfermedades o trastornos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares, cirrosis hepática y trastornos del tejido conectivo (incluyendo aquellos asociados a los ligamentos, tendones y cartílago), y trastornos vasculares asociados a la exposición del colágeno. Las partículas del vector se pueden utilizar para suministrar genes terapéuticos con el

fin de restaurar la función celular endotelial y para combatir la trombosis, además de limitar las respuestas proliferativas y fibróticas asociadas a la formación de neointima. Las partículas del vector se pueden emplear también en el tratamiento de lesiones vasculares, lesiones ulcerativas, zonas inflamadas, lugares de lesión con láser, tal como el ojo, por ejemplo; lugares quirúrgicos; articulaciones artríticas; cicatrices y queloides. Las partículas del vector se pueden emplear también para curar heridas.

Las partículas del vector se pueden emplear también en el tratamiento de tumores, incluyendo tumores malignos y no malignos. Aunque los Solicitantes no pretendan limitarse a razonamientos teóricos, los tumores, cuando invaden los tejidos u órganos normales, secretan enzimas tales como colagenasas o metaloproteinasas que participan en la exposición de los componentes de la matriz extracelular. Al dirigir las partículas del vector hacia estos componentes expuestos de la matriz extracelular, las partículas del vector se concentran en los componentes expuestos de la matriz adyacentes al tumor, con lo cual las partículas del vector infectan entonces las células tumorales. Estos tumores incluyen, pero no se limitan a, carcinomas, sarcomas, incluyendo condrosarcomas, osteosarcomas y fibrosarcomas; así como tumores cerebrales. Por ejemplo, una partícula del vector, tal como una partícula del vector retroviral, que incluye una proteína de envoltura modificada incluyendo un polipéptido marcador que se une a un componente de la matriz extracelular localizado en un lugar tumoral y un polinucleótido que codifica un marcador selectivo negativo o gen "suicida", por ejemplo el gen timidina quinasa (TK) del virus del Herpes Simplex, se puede administrar a un paciente, con lo cual las partículas del vector transducen las células tumorales. Después de que las células tumorales se hayan transducido con las partículas del vector, un agente de interacción, tal como ganciclovir o aciclovir, se administra al paciente, con lo cual se matan las células tumorales transducidas.

Otros polinucleótidos que codifican agentes antitumorales que pueden estar incluidos en las partículas del vector incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos que codifican los agentes de control del ciclo celular, polinucleótidos (por ejemplo polinucleótidos antisentido) que se unen a los polinucleótidos que codifican la ciclina G1 o ciclina D1, proteínas supresoras de tumores, factores antiangiogénicos, por ejemplo polipéptido-2 activador de monocitos endoteliales (EMAP-2), citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo aquellas citoquinas y factores de crecimiento descritos anteriormente aquí. Las partículas del vector que incluyen estos polinucleótidos se administran a un paciente, con lo cual las partículas del vector se unen a un componente de la matriz extracelular localizado en el lugar del tumor, y luego transducen las células tumorales. El crecimiento de las células tumorales es inhibido, suprimido o destruido a la expresión del agente antitumoral por las células tumorales transducidas.

Se debe entender que la presente invención no se debe limitar al tratamiento de alguna enfermedad o trastorno particular.

Las partículas del vector, que incluyen la proteína de superficie viral modificada y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, se pueden administrar a un animal *in vivo* como parte de un modelo animal para el estudio de la eficacia de un tratamiento de terapia genética. Las partículas del vector se pueden administrar variando las dosis a distintos animales de la misma especie, con ello las partículas del vector se unirán a un componente de la matriz extracelular en el animal. Luego se evalúan los animales en cuanto a la expresión del agente terapéutico deseado *in vivo*. A partir de los datos obtenidos de estas evaluaciones, se puede determinar la cantidad de partículas del vector que debe administrarse a un paciente humano.

Las partículas del vector, que incluyen la proteína de superficie viral modificada y un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, se pueden concentrar a partir de stocks diluidos del vector *in vitro*, poniendo en contacto un stock diluido del vector con un componente de la matriz extracelular al que se unirá la proteína de superficie viral modificada. Esta unión permite obtener un stock concentrado de partículas del vector.

Además, las proteínas de superficie virales modificadas de la presente invención se pueden emplear para formar proteoliposomas; es decir, la proteína de superficie viral modificada forma una parte de la pared del liposoma. Estos proteoliposomas se pueden emplear para la transferencia genética o para el suministro de medicamentos a células localizadas en un lugar de un componente expuesto de la matriz extracelular.

Ejemplos

A continuación se describe la invención con respecto a los siguientes ejemplos; sin embargo, el alcance de la presente invención no pretende limitarse a los mismos.

Ejemplo 1

Cee+ es un vector de expresión de CMV-env construido mediante la digestión de CEE (Morgan y col., *J. Virol*., Vol. 67, No. 8, páginas 4712-4721 (agosto de 1993)) con HindIII y NotI, llenando el lugar de NotI con un fragmento Klenow y ligando el cassette de CMV-env en pBluescript II SK+ (Stratagene, La Jolla, California) digerido con SmaI e HindIII. Entonces se empleó PCR y tecnologías de ADN recombinante para obtener el constructo ECB-CEE+, que incluye un polinucleótido que codifica una proteína de envoltura quimérica gp70 basada en el virus de la Leucemia Murina de Moloney y que incorpora un dominio de unión a colágeno de alta afinidad dentro de su estructura primaria (Figura 1A). El dominio modificado de unión a colágeno procedía de un dominio funcional dentro del Factor von

Willebrand involucrado en el reconocimiento de las secuencias de colágeno vascular expuesto (Takagi y col., *Biochemistry*, Vol. 32, páginas 8530-8534 (1992); Tuan y col., *Conn. Tiss. Res.*, Vol. 34, páginas 1-9 (1996)). ECB-CEE+ incorpora un polipéptido que incluye el decapéptido de unión a colágeno WREPSFMALS. Este constructo se diseña específicamente para dirigir un retrovirus al colágeno expuesto por lesión, inflamación, enfermedad o por procedimientos quirúrgicos reparadores. El residuo de cisteína de la secuencia original del Factor von Willebrand fue sustituido de forma conservadora por una metionina, para que el dominio de unión a colágeno no interfiriera en la elaborada formación del enlace disulfuro necesario para el plegado y/o la renaturalización de gp70. Los conectores flanqueantes se diseñaron también para incluir residuos de glicina con el fin de aumentar la flexibilidad rotacional y para minimizar los impedimentos estéricos, al igual que se incluía un residuo de histidina para favorecer una conformación externa del dominio de unión a colágeno. La inserción completa del polipéptido de 19 aminoácidos, que incluye el decapéptido de unión a colágeno, se muestra en las Figuras 1A y 1B.

El constructo ECBT-CEE+ incluye los mismos componentes que ECB-CEE+, así como un lugar putativo de segmentación de la trombina de un residuo de seis aminoácidos, con la secuencia LVPRGS, entre el dominio de unión a colágeno y el resto de la proteína de envoltura.

Se construyeron ECB-CEE+ y ECBT-CEE+ utilizando PCR y tecnologías de ADN recombinante tal como se ha mencionado anteriormente. El decapéptido de unión a colágeno WREPSFMALS es codificado por el siguiente polinucleótido: TGG CGC GAA CCG AGC TTC ATG GCT CTG AGC. Se emplearon los siguientes cebadores de PCR para la fabricación de ECB-CEE+.

Sentido (CBD-S1): 5' -ATC ACC TGG GAG GTA ACC GGC CAT ATG TGG CGC-3'

Antisentido (CBD-aS1): 5' -CG ATC TCC ATT GGT TAC CAA GCT AGC ACC GCT-3'

Se empleó también CBD-S1 para fabricar ECBT-CEE+, junto con el siguiente cebador antisentido CBDT-aS2:

5' -CG ATC TCC ATT GGT TAC CAA GCT GCC GCG CGG CAC CAG ACC GCT CAG AGC-3'.

Los dominios de unión a colágeno con sus propios conectores fueron amplificados por PCR utilizando los iniciadores CBDS1 y CBDaS1 o CBDS1 y CBDaS2 respectivamente (94ºC 1 min, 55ºC 10 min, 72ºC 10 min, 35 ciclos). Luego las bandas PCR fueron digeridas con BstEII. Cee+ fue digerido con BstEII, seguido de desfosforilación del vector linealizado de Cee+. Las bandas PCR digeridas se ligaron al vector linealizado de Cee+ para formar ECB-CEE+ y ECBT-CEE+. Las propias orientaciones de los constructos de cADN fueron confirmadas por análisis de secuencia.

ECB-CEE+ se cortó con NheI y EcoRI, y un fragmento de NheI/EcoRI que incluía un polinucleótido que codifica una envoltura retroviral ecotrópica modificada fue ligado al plásmido pET28 digerido por NheI y EcoRI (Tuan y col., *Conn. Tiss. Res.*, Vol. 1, páginas 1-9 (1996)) para formar pET28SU-ECB-CEE+. El plásmido pET28SU-ECB-CEE+ incluye un polinucleótido que codifica una proteína quimérica de fusión que contiene una serie contigua de dominios-a funcionales de tag His-6 de purificación y un dominio de unión a colágeno derivado del Factor von Willebrand dentro de la estructura de la envoltura seguido de la región madura de superficie (SU) del polipéptido de env de MoMuLV, gp70, que comprende los residuos aminoácidos 34 a 474, excluida la secuencia líder (Figura 2A). Como se muestra en la Figura 2A, los residuos aminoácidos 1 a 33 son la secuencia líder. El residuo aminoácido 34 de la Figura 2A corresponde al residuo aminoácido 1 en la Figura 1A y la SEQ ID NO:1. Las inserciones ECB y ECB(T) empiezan cada una en el residuo aminoácido 52.

El plásmido pET28SU-ECB-CEE+ se transformó en la cepa BL21 (DE 3) de *E. coli* y la expresión de alto nivel de las proteínas recombinantes fue inducida en presencia de IPTG 1mM durante 4 horas a 37ºC. La proteína recombinante inducida de fusión fue aislada de los cuerpos bacterianos de inclusión, solubilizada en urea purificada 8M en condiciones de desnaturalización por cromatografía de quelatos metálicos (níquel) (Qiagen), renaturalizada por dilución lenta (1:5) en un tampón Redox (20 mM Tris HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl, 0,05% NP 40, 2 mM glutatión reducido y 0,2M glutatión oxidado) y replegada durante 16 horas a 4ºC, seguido de diálisis en etapas prolongadas en 20 mM Tris HCl, pH 5,0, 250 mM NaCl, clarificada por centrifugación a 10.000g y almacenada a -70ºC hasta su utilización. En la Figura 2B se muestra el SDS-PAGE que demuestra la expresión, purificación y renaturalización de la proteína recombinante.

La unión de la proteína recombinante al colágeno se determinó como sigue:

Aproximadamente 1 μg de la proteína se aplicó luego a placas microtituladas recubiertas de colágeno y se dejó que se unieran durante 20 minutos, seguido de lavado. Se incubaron las placas durante 4 horas a temperatura ambiente a una dilución primaria de anticuerpos de 1:1.000. Se aplicó entonces un anticuerpo biotinilado de cabra a IgG de rata, seguido de un conjugado peroxidasa de estreptavidina-rábano. Se utilizó diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, seguido de un incremento por cloruro de níquel para las placas microtituladas. Se demostró también que la proteína quimérica renaturalizada de fusión unida a las matrices de colágeno de alta afinidad no se eliminaba por lavado con PBS (Línea 1), 1M NaCl (Línea 2) o 2M urea, y necesitó al menos urea 3M para liberar en la solución la proteína unida a colágeno (Figura 2C).

ECB-CEE+ fue transfectado en las células preproductoras GPL (Morgan y col., 1993) y 293T (Pear y col., *Proc. Nat. Acad. Sci*., Vol. 90, páginas 8392-8396 (Sept. 1993); Solicitud PCT Nº WO94/19478, publicada a 1 de septiembre de 1994), mediante la precipitación de fosfato de calcio, y se controló la expresión de la proteína recombinante por detección inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal de rata 83A25 (Evans y col., *J. Virol*., Vol. 64, No. 12, páginas 6176-6183 (1990)) dirigido contra la proteína de envoltura del virus de la Leucemia Murina de Moloney. La expresión de la proteína de envoltura quimérica que lleva el dominio auxiliar de unión a colágeno fue confirmada por tinción inmunocitoquímica en las células GPL y 293 (Figuras 3A, 3B y 3C). La Figura 3A muestra células de GPL transfectadas en vacío que no muestran tinción positiva alguna para la proteína de envoltura gp70. La Figura 3B muestra células de GPL transfectadas con CEE+ (que expresan gp70 de tipo salvaje). Se muestra la coloración parduzca de la proteína de envoltura gp70 dentro de las células transfectadas. La Figura 3C muestra las células de GPL transfectadas con ADN del plásmido quimérico env de ECB-CEE+. La coloración positiva para la proteína quimérica gp70 se muestra dentro de las células transfectadas. Por tanto, la inserción de una secuencia de unión a colágeno en la secuencia de gp70 no inhibió la expresión de la proteína de envoltura en las células transfectadas. En las células 293T, la expresión superficial celular de la proteína de envoltura quimérica fue detectada por inmunofluorescencia utilizando el análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (Kadan y col., *J. Virol*., Vol. 66, página 2281 (1992); Morgan y col., *J. Virol*., Vol. 67, página 4712 (1993); Yu y col., *J. Virol*., Vol. 69, página 6557 (1996)). La expresión de la proteína quimérica gp70 fue confirmada también por análisis Western (Figura 3D). El Western Blot muestra la comigración de la proteína de envoltura quimérica de ECB-CEE+ con la proteína de envoltura de tipo salvaje de CEE+ (bandas de Mn de aproximadamente 70 kDa), así como la comigración de las proteínas gag en la región de 30 kDa.

Con el fin de generar stocks retrovirales para otro estudio, se empleó un sistema de cotransfección transitoria con tres plásmidos (Soneoka y col., *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, páginas 628-633 (1995)). Se suministraron 10 μg cada uno de (i) pHIT60; (ii) pHIT110 ó pHIT112; y (iii) CEE+ ó ECB-CEE+ por transfección transitoria de un 70% de células confluentes 293T que expresan el antígeno T de SV40 en 10 cm de cubetas de cultivo utilizando fosfato de calcio, durante 14-18 horas, a 37ºC, un 5% de CO_2. El plásmido pHIT60, suministrado por la Dra Paula Cannon, Universidad de Oxford, Oxford, Reino Unido, incluye el origen de la replicación de SV40 y el gen retroviral gag-pol bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV). El plásmido pHIT110, también suministrado por la Dra Paula Cannon, incluye un gen β-galactosidasa (LacZ) bajo el control de un promotor de CMV. El plásmido pHIT112, suministrado por Ling Li, USC Gene Therapy Laboratories, Los Angeles, California, incluye también un gen LacZ bajo el control de un promotor de CMV. Los plásmidos pHIT60, pHIT110 y pHIT112 se describen además en Soneoka y col. Luego se trataron los cultivos con 6 ml de butirato de sodio 10 mM durante 10 a 12 horas, para optimizar la producción viral (Soneoka, y col.). A continuación se sustituyó el medio por D10 y se mantuvieron los cultivos a 37ºC durante otras 12 horas antes de cosechar los sobrenadantes virales.

Las valoraciones virales se determinaron en base a la expresión de la resistencia a la neomicina y/o de los genes reporteros β-galactosidasa. Se colocaron en placas 2,5 x 10^4 células 3T3 NIH en cada una de las placas de 6 pocillos un día antes de la transducción. Se sustituyó el medio por 1 ml de diluciones seriales de sobrenadante viral con 8 μg/ml de Polybrene durante 2 horas, después de lo cual se añadió 1 ml de D10 fresco a los cultivos que se mantuvieron luego durante toda la noche a 37ºC, un 5% de CO_2, después de lo cual se añadió G418 (800 μg/ml) y se contaron las colonias resistentes a G418 10 días más tarde y se expresaron como unidades formadoras de colonias resistentes a G418 (cfu)/ml. Para la expresión de la β-galactosidasa, los cultivos respectivos se tiñeron con X-gal 48 horas después de la transducción de las células 3T3 NIH.

La introducción simultánea de los plásmidos anteriormente mencionados en las células 293T que expresan el antígeno T de SV40, seguido de tratamiento con butirato de sodio, produjo valoraciones del vector retroviral de hasta 8 x 10^6 cfu/ml, tal como se determina por la expresión de neo^R y β-galactosidasa en las células 3T3 NIH. Suspendidos en el sobrenadante del cultivo celular, los virus que contienen la secuencia de envoltura quimérica mostraron valoraciones que se aproximaban a las del virus de tipo salvaje en condiciones estandardizadas (valoraciones relativas: 0,66 ± 0,42 de tipo salvaje, utilizando pHIT110, n=4; 0,53 ± 0,45 utilizando un vector de β-galactosidasa nuclearmente dirigido, pcnBg, n=3), indicando que la incorporación del dominio auxiliar de unión a colágeno no perjudicó sustancialmente la infectividad del virus modificado. Se recogieron los virus ECB-CEE+ y se evaluó la afinidad para las matrices de colágeno en comparación con los virus CEE+ de tipo salvaje, utilizando una modificación de las técnicas estándar ELISA. En el ensayo ELISA, se aplicaron 50 μl del sobrenadante del vector (valoración del virus de 3,2 x 10^3 cfu/ml para ECB-CEE+ y 5,2 x 10^4 cfu/ml para CEE+) a cada pocillo microtitulado recubierto de colágeno y se dejó que se uniera durante 20 minutos, seguidamente se lavó 1 x PBS, seguido de incubación durante 4 horas a temperatura ambiente a una dilución primaria de anticuerpos de 1:1.000. Se aplicó entonces un anticuerpo biotinilado de cabra IgG de rata, seguido de un conjugado peroxidasa de estreptavidina-rábano. Se utilizó diaminobenzidina (DAB) como cromógeno seguido del incremento por cloruro de níquel para las placas microtituladas. Después de un lavado sencillo con una solución salina fisiológica, sólo los virus que llevan la proteína quimérica env siguieron unidos al colágeno (Línea 1, pocillos de coloración oscura) a su lavado con PBS, mientras que se eliminaron los viriones CEE+ de tipo salvaje (Figura 3E).

La capacidad de las matrices de colágeno para concentrar los vectores retrovirales de ECB-CEE+ a partir de soluciones diluidas se examinó primero mediante la aplicación del sobrenadante retroviral a placas de cultivo de 6 pocillos recubiertos de colágeno, lavando las placas de cultivo con una solución salina fisiológica y sembrando luego una monocapa de células sobre las placas lavadas. De forma específica, 1,5 ml del sobrenadante del vector que lleva ECB-CEE+, CEE+ de tipo salvaje o el tampón (valoración viral: 4,4 x 10^3 cfu/ml para ECB-CEE+ y 9,1 x 10^4 para

CEE+) se incubaron a 37ºC en placas de 6 pocillos en los que se aplicó un islote de colágeno (dentro de un anillo de clonación), y se lavó dos veces con 1X PBS. Se colocaron luego 1 x 10^5 células 3T3 NIH suspendidas en un medio FBS al 10% en DMEM que contenía 8 μl/ml de Polybrene en las placas, en cada pocillo. Se incubaron los cultivos a 37ºC durante toda la noche, se sustituyeron por el medio D10 que no contenía Polybrene y se tiñeron con X-Gal después de 24 horas más de incubación a 37ºC. Como se muestra en la Figura 4A, el vector retroviral dirigido a colágeno siguió unido a la matriz de colágeno en condiciones en las que se eliminó por lavado el CEE+ de tipo salvaje. A partir de las eficacias de transducción (20-40%) observadas en las células 3T3 NIH que recubrían el colágeno unido al virus (Figura 4B), el efecto de concentración observado en estas condiciones fue al menos dos órdenes de magnitud más grande que la valoración ensayada de los sobrenadantes originales.

En base a las observaciones anteriores de que la vida media biológica de la proteína de fusión TGF-β1 dirigida a colágeno (Tuan y col., *Conn. Tiss. Res*., Vol. 34, páginas 1-9 (1996)) se puede extender mediante la asociación física con colágeno, se anticipó que los vectores retrovirales dirigidos a colágeno pueden aumentar también su resistencia a la inactivación por los componentes del suero. Se examinó la infectividad comparativa de los viriones de ECB-CEE+ en presencia de suero humano normal en condiciones estandardizadas. Se sometieron a ensayo las células 3T3 NIH en busca de la expresión de β-galactosidasa 48 horas después de la transducción con el vector de ECB-CEE+ o ECB-CEE+ en suspensión. Antes de la transducción de las células 3T3 NIH, los viriones de ECB-CEE+ unidos a colágeno y los viriones de ECB-CEE+ en suspensión se expusieron a suero humano normal al 10% durante varios períodos de tiempo, seguido de la inactivación del complemento a 50ºC durante 30 minutos.

Más en particular, 50 μl del sobrenadante de ECB-CEE+ se aplicaron tres veces a cada pocillo recubierto de colágeno y se incubaron los virus a 37ºC durante 30 minutos. Luego, el vector unido a colágeno se expuso a suero humano normal al 10% durante varios períodos de tiempo, después de lo cual se aplicaron en placas durante 2 horas 1 x 10^3 células en D10, conteniendo 8 μg/ml de Polybrene. Después de la sustitución por el medio D10 fresco, se incubaron los cultivos a 37ºC en un 5% durante 38 horas, después de lo cual se tiñeron los cultivos con la coloración X-gal. Para comparar, 50 μl del sobrenadante de ECB-CEE+ (ECB-CEE+ en suspensión) fueron expuestos inicialmente a un 10% de suero humano normal durante varios períodos de tiempo, después de lo cual se calentaron las muestras hasta 50ºC para inactivar el complemento, y luego se aplicaron a 1 x 10^3 células en pocillos no recubiertos, en presencia de 8 μg/ml de Polybrene durante toda la noche. Luego se sustituyó el medio por el medio D10 fresco y se mantuvieron los cultivos durante 48 horas antes de la coloración con X-gal. Se determinó la eficacia de la transducción mediante el conteo del número de células con núcleos de coloración azul en un total de 300 células. Los resultados se expresan como porcentaje de eficacia de transducción antes de la incubación con suero humano normal, lo que va paralelo al porcentaje con suero inactivado por calor (n = 3 para cada grupo). La significación de la diferencia entre los dos grupos se evaluó mediante el test T-Student. La eficacia de transducción de los viriones de ECB-CEE+ en colágeno fue superior a la de los viriones ECB-CEE+ en suspensión a 1 ó 2 minutos de incubación con suero.

En contraste con el virus de tipo salvaje que es inactivado rápidamente por los componentes del suero (Bartholomew y col., *J. Exp. Med*., Vol. 147, páginas 844-853 (1978); Rother, y col., *J. Exp. Med*., Vol. 182, páginas 1345-1355 (1995); Pensiero y col., *Human Gene Therapy*, Vol. 7, páginas 1095-1101 (1996), los viriones de ECB-CEE+ fueron más resistentes, mostrando eficacias apreciables de transducción en presencia de suero humano normal (Figura 4C), mientras que el virus de tipo salvaje y los viriones de ECB-CEE+ en suspensión fueron inactivados en un minuto de exposición a un 10% de suero humano normal, la infectividad de los viriones unidos a colágeno disminuyó, pero no se eliminó. Se descubrió que la resistencia de los viriones de ECB-CEE+ a la inactivación del suero dependía de su unión al colágeno, más que de la modificación de la proteína de envoltura misma, y era responsable de su protección selectiva.

Ejemplo 2

La mayor ventaja de la terapia genética con respecto a la terapia farmacológica convencional para la enfermedad cardiovascular consiste en el potencial que la transducción de las células vasculares en lugares específicos tendrá como resultado en efectos celulares localizados y/o en niveles sostenidos de producción de proteínas en las células vasculares diana (Feldman y col., *Cardiovascular Res*., Vol. 32, páginas 194-207 (1996); Gibbons y col., *N. Engl. J. Med*., Vol. 330, páginas 1431-1438 (1994)). La restenosis después de la lesión vascular representa un objetivo destacado de la terapia genética cardiovascular en base a su alta incidencia (Glagov, *Circulation*, Vol. 89, páginas 2888-2891 (1994); Schwartz y col., *Am. Coll. Cardiol*., Vol. 17, página 1284 (1992); Myers, *Wound Healing Responses in Cardiovascular Disease*, Weber, ed., Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., páginas 137-150 (1995)) y la no reprocidad con las aproximaciones convencionales (Hermans y col., *Am. Heart J*., Vol. 122, páginas 171-187 (1991); Popma y col., Circulation, Vol. 83, páginas 1426-1436 (1991); Feldman y col., *Fundam. Clin. Pharmacol*., Vol. 9, páginas 8-16 (1995)). Con el fin de investigar las propiedades de unión de la proteína de envoltura quimérica a la vasculatura lesionada frente a la no lesionada, se aplicó la proteína de envoltura quimérica SU-ECB-CEE+ renaturalizada a un segmento de aorta normal de ratón o de vena cava inferior (IVC) y a segmentos aórticos o venosos en los que la capa endotelial había sido denudada por el paso de un catéter. De forma más específica, se aislaron los segmentos de aorta y de vena cava inferior y se lavaron los lúmenes con una solución salina fisiológica para eliminar los elementos sanguíneos. El endotelio fue denudado en varios pasos con un catéter para embolectomía 2F Intimax, hinchado hasta un volumen de 10 μl, por el lumen de los segmentos de vasos. 50 μl de la proteína de envoltura quimérica purificada o de tampón (control) se infiltraron en el lumen durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los lúmenes de los segmentos de los vasos se lavaron entonces dos veces con una solución salina fisiológica, y luego se colocaron los segmentos

aislados en tubos microfugos que contenían 200 μl de proteína de envoltura quimérica o tampón durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Los segmentos tratados y no tratados de SU-ECB-CEE+ se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y las secciones crionizadas se fijaron en acetona para su coloración inmunohistoquímica con el fin de detectar la proteína de envoltura quimérica unida a colágeno. La Figura 5A muestra un segmento aórtico lesionado por catéter que no ha sido tratado. La Figura 5B muestra una ampliación más alta del segmento mostrado en la Figura 5A. La Figura 5C muestra la unión de la proteína de envoltura quimérica SU-ECB-CEE+ (material de coloración roja) a un segmento aórtico lesionado. La Figura 5D muestra la ausencia de unión de la proteína de envoltura quimérica en un segmento aórtico tratado no lesionado. La Figura 5E muestra la unión de la proteína de envoltura quimérica (material de coloración roja) a un segmento de vena cava inferior lesionada. En estos experimentos, aproximadamente 1 μg de proteína renaturalizada de SU-ECB-CEE+ fue infiltrado en los segmentos aórticos lesionados y no lesionados, seguido de una limpieza con una solución salina fisiológica. Luego los segmentos lesionados y no lesionados se congelaron en nitrógeno líquido y entonces las secciones crinizadas fijadas en acetona se sometieron a análisis inmunocitoquímico utilizando el anticuerpo monoclonal 82A25 a gp70 y un sistema de detección por inmunoperoxidasa.

Las placas microtituladas recubiertas de colágeno y las secciones crinizadas de segmentos aórticos o de la vena cava inferior tratados o no tratados, lesionados o no lesionados se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente, a una dilución primaria de anticuerpos de 1:1.000. Se aplicó entonces un anticuerpo biotinilado de cabra IgG de rata, seguido de un conjugado peroxidasa de estreptavidina-rábano. Se utilizó diaminobenzidina (DAB) como cromógeno, seguido del incremento por cloruro de níquel para las placas microtituladas. Las láminas histológicas fueron recontadas por tinción con hematoxilina.

Como se muestra en las Figuras 5A a 5D, la proteína de envoltura SU-ECB-CEE+ dirigida a colágeno se unió selectivamente a la capa subendotelial expuesta a la lesión por catéter y no se unió al segmento aórtico no lesionado. Del mismo modo, la proteína de envoltura quimérica se unió selectivamente al subendotelio de la vena cava lesionada (Figura 5E).

La infectividad de los viriones de ECB-CEE+ se demostró por primera vez *in vivo* en tejidos proliferativos de un ratón recién nacido. La Figura 5F muestra la transducción *in vivo* por los viriones de ECB-CEE+ mediante la expresión del transgen de β-galactosidasa dirigido nuclearmente en condrocitos (núcleos de coloración azul) después de la inyección del sobrenadante del vector (valoración = 1 x 10^3) en la cola de un ratón recién nacido.

Para investigar además el rendimiento del vector retroviral dirigido a colágeno *in vivo*, se examinó la transducción de las células vasculares seguido de la lesión con catéter de balón en un modelo de restenosis vascular en ratas. Bajo anestesia general (cetamina, 10 mg/kg; rompun, 5 mg/kg) de acuerdo con el protocolo aprobado por la USC Institution Animal Care and Use Committee, se utilizó un catéter para embolectomía arterial 2F Intimax (Applied Medical Resources Corp., Laguna Hills, California) para denudar el endotelio de la arteria carótida de ratas Wistar (pesando cada una 400 a 500 gramos). Se insertó el catéter en una arteria carótida externa que fue ligada distalmente y se pasó a través de la arteria carótida común. Se infló el balón hasta un volumen de 10 μl y se pasó tres veces a través de toda la longitud de la arteria carótida común. Después de la lesión del balón, se quitó el catéter para embolectomía y la arteria carótida interna se ligó transitoriamente justo distalmente a la bifurcación. La mitad distal del segmento lesionado se ligó del mismo modo transitoriamente. Cada rata recibió una infusión de sobrenadante de vector de ECB-CEE+ (titulaciones: 2 x 10^4 a 8 x 10^5 cfu/ml) 4 a 7 días después de la lesión del balón, después de lo cual se dejó que las ratas se recuperasen y se les alimentó con una dieta regular para ratón/rata y agua a voluntad. Se sacrificaron las ratas en el momento especificado mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/kg intramuscular), y las secciones congeladas de arteria carótida lesionada se colorearon con la tinción roja Siris y X-gal. Se examinaron las secciones histológicas por microscopía visible para la expresión de la β-galactosidasa dirigida nuclearmente. Como se muestra en la Figura 6A, la transducción de la pared arterial se limitó al lugar de la lesión vascular (zona entre corchetes). El análisis histoquímico de los segmentos arteriales fijados en formalina (Figura 6B) reveló la penetración extensa del vector en la túnica media de la arteria lesionada, evidenciada por la transducción de numerosas células musculares lisas (Figuras 6B y 6C). Estas observaciones, en principio, demuestran la utilidad de las proteínas de envoltura retrovirales construidas genéticamente para localizar el suministro viral en un lugar específico de la lesión vascular.

Discusión

Estudios previos demostraron la factibilidad de utilizar vectores retrovirales para la transferencia genética directa en la pared arterial (Nabel y col., *Science*, Vol. 249, páginas 1285-1288 (1990); Flugelman y col., *Circulation*, Vol. 85, páginas 1110-1117 (1992); Wilson y col., *Science*, Vol. 244, páginas 1344-1346 (1989); Dichek y col., *Blood*, Vol. 77, páginas 533-541 (1991)). Se descubrió que la eficacia de transducción, sin embargo, era baja (< 0,1%), debido en parte a la baja velocidad de proliferación celular (necesaria para la integración retroviral) descubierta en la pared arterial intacta normal y a la incapacidad de obtener cantidades adecuadas de stocks retrovirales de alta concentración (> 1 x 10^6 partículas/ml) necesarios para una transferencia genética eficaz (Nabel, *Circulation*, Vol. 91, páginas 541-549 (1995)). Los ejemplos anteriores describen la construcción y el rendimiento de un vector retroviral dirigido a colágeno que permanece estable e infeccioso a su unión a colágeno. La asociación física de la proteína de envoltura quimérica del virión a colágeno tiene ramificaciones *in vitro* e *in vivo*: *in vitro*, en términos de purificación por afinidad y concentración de stocks virales a partir de soluciones diluidas, e *in vivo*, en términos de fomentar el suministro dependiente de la concentración de los genes terapéuticos. Los datos apoyan el concepto de que los componentes de la matriz extracelular misma pueden ser componentes de acceso ventajosos en futuras estrategias de suministro

genético. Se ha demostrado que la unión no específica de las partículas retrovirales a los fragmentos de fibronectina aumentaba la eficacia de transducción en células de mamíferos (Henenberg y col., *Nature Medicine*, Vol. 2, páginas 876-882 (1996)). El marcado de alta afinidad de los factores de crecimiento (Tuan y col., *Conn. Tiss. Res*., Vol. 34, páginas 1-9 (1996)) y los vectores retrovirales a la fibronectina se puede utilizar para facilitar el suministro genético en la gestión clínica de la curación de heridas. Los ejemplos anteriores muestran también que la estrecha asociación con colágeno hace que el virión sea menos sensible a la inactivación por suero humano, lo que ocurre supuestamente a través de los mecanismos mediados por el complemento (Bartholomew y col., *J. Exp. Med*., Vol. 147, páginas 844-853 (1978); Rother y col., *J. Exp. Med*., Vol. 182, páginas 1345-1355 (1995); Pensiero y col., *Human Gene Therapy*, Vol. 7, páginas 1095-1101 (1995)). Esta propiedad de resistencia al complemento puede ser de considerable utilidad en el diseño de futuros vectores inyectables.

Inicialmente identificado como factor hemostático en estudios de hemofilias heredadas (Wagner, *Ann. Rev. Cell Biol*., Vol. 6, página 217 (1990); Montgomery and Scott, *Hematology of Infancy and Childhood*; Nathan y col., eds. Philadelphia, W.B. Saunders, Vol. 2, Ed. 4, páginas 1605-1650 (1993)), el factor von Willebrand realiza una función vital de vigilancia al dirigir los agregados plaquetarios hacia las lesiones vasculares (Ginsburg and Bowie, *Blood*, Vol. 70, páginas 2507-2519 (1992)). La transposición de un dominio de unión a colágeno derivado del factor von Willebrand para alterar la distribución, concentración y estabilidad de los vectores retrovirales de suministro genético fue demostrada en los ejemplos anteriores. Estos vectores dirigidos a colágeno se pueden utilizar para aumentar la eficacia de la transferencia genética localizada, suministrando genes terapéuticos para restaurar la función celular endotelial y para combatir la trombosis, además de limitar las respuestas proliferativas y fibróticas asociadas a la formación de neointima. Los vectores dirigidos anteriormente mencionados podrían tener también implicaciones importantes en el diseño y eficacia de estrategias sistémicas de terapia genética. La aplicación de vectores de marcados de gran eficacia que, como el factor von Willebrand mismo, desempeñan una función de vigilancia dentro de la vasculatura, puede representar un mayor avance en el potencial para tratar la enfermedad arterial coronaria y el derrame cerebral. En el sentido de que el colágeno está expuesto debido a lesiones traumáticas, inflamatorias, ulcerativas y metastáticas, así como los lugares de intervención quirúrgica, estos vectores retrovirales dirigidos proporcionan nuevas aproximaciones para avanzar en la terapia genética en otras zonas de intervención quirúrgica.

Ejemplo 3

Los plásmidos (i) pHIT60; (ii) pHIT110 ó pHIT112; (iii) ECB-CEE+; y (iv) pCAE (Morgan y col., J. Virol., Vol. 67, No. 8, páginas 4712-4721 (1993)), un plásmido que incluye un polinucleótido que codifica la proteína de envoltura anfotrófica de tipo salvaje o pCEE fueron transfectados en células 293T según los procedimientos de Soneoka y col., 1995, anteriormente descritos. Como consecuencia, se generó el vector retroviral ECB-CEE+.CAE, que coexpresa la proteína de envoltura anfotrófica de tipo salvaje con la proteína de envoltura ECB-CEE+ ecotrópica modificada. Las valoraciones virales se determinaron mediante la resistencia a la neomicina y la expresión de β-galactosidasa en las células 3T3 NIH, tal como se describe en el Ejemplo 1. Las valoraciones oscilaban entre 10^5 y 10^7 cfu/ml.

Los niveles de expresión de la proteína de envoltura gp70 y la proteína gag p30 en los lisatos de las células 293T que llevan los vectores con las proteínas CEE+ de tipo salvaje, ECB-CEE+, CAE de tipo salvaje y ECB-CEE+.CAE de la envoltura fueron evaluados por análisis Western Blot. Las células 293T fueron transfectadas con los plásmidos de expresión de la envoltura, fueron lisados 48 horas más tarde en 500 μl de tampón de lisis durante 10 minutos y centrifugados a 10.000 g hasta núcleos en gránulos. Los lisatos celulares se resolvieron en un gel prefabricado del 8 al 10% y se detectaron el precursor Pr85 de la proteína de envoltura y la subunidad gp70 de la proteína superficial procesada utilizando un antisuero específico de cabra (Zhu y col., Circulation, Vol. 96, páginas 628-635, (1997)). Se muestra el Western Blot en la Figura 7. Como se muestra en la Figura 7, la Línea 1 es un control (transfectado en vacío), la Línea 2 es CEE+ del tipo salvaje, la Línea 3 es ECB-CEE+ solo, la Línea 4 es CAE de tipo salvaje, y la Línea 5 es ECB-CEE+.CAE. Como se muestra en la Figura 7, la proteína de ECB-CEE+.CAE de la envoltura se expresó eficazmente en las células 293T, como lo hicieron las proteínas de CAE y CEE+ de tipo salvaje y ECB-CEE+ solo. La proteína de envoltura coexpresada conservó su propiedad y estructura cuaternaria nativa. Estos datos sugieren que la proteína de envoltura ecotrópica quimérica se coexpresa y procesa con la proteína de envoltura anfotrópica de tipo salvaje en las células 293T.

El nivel de expresión superficial celular de la proteína de envoltura se midió mediante análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) de las células 293T transfectadas que expresaron las proteínas de envoltura de tipo salvaje y quiméricas. Las células 293T transfectadas con los vectores de expresión de la proteína de envoltura se incubaron con un anticuerpo monoclonal, 83A25, contra gp70 (Evans y col., 1990). Las células se lavaron y se resuspendieron 1:100 de anticuerpo de cabra anti-rata marcado con fluorescencia. Se muestran en la Figura 8 los modelos de citometría de flujo con inmunofluorescencia indirecta para las envolturas de CEE+ de tipo salvaje, ECB-CEE+, CAE de tipo salvaje, y ECB-CEE+.CAE. Los resultados se expresan como intensidad relativa de la fluorescencia. La zona de control negativo (células 293T transfectadas en vacío) viene indicada a la izquierda de la línea vertical. Como se muestra en la Figura 8, el grado de expresión superficial celular de las proteínas de envoltura dirigidas a colágeno, ECB-CEE+ y ECB-CEE+.CAE, era similar al de las proteínas de envoltura de tipo salvaje, CEE+ y CAE, indicado por un cambio de intensidad relativa de la fluorescencia a la derecha de la línea vertical negativa.

La Figura 9 muestra la unión viral a células CHO10 que expresan solamente los receptores ecotrópicos y a células 293T que expresan solamente los receptores anfotrópicos. Se muestran los modelos de citometría de flujo con

inmunofluorescencia indirecta para las células diana después de la unión del virus y la incubación con el anticuerpo monoclonal 83A25. Los resultados se expresan como intensidad relativa de fluorescencia. La zona de control negativo (células transfectadas en vacío) viene indicada a la izquierda de la línea vertical. Como se muestra en la Figura 9, los viriones dirigidos a colágeno que coexpresan una envoltura ecotrópica quimérica y una envoltura anfotrópica de tipo salvaje (ECB-CEE+.CAE), unidos tanto a las células CHO10 como a las células 293T (un 50% tanto de CEE+ de tipo salvaje como de CAE; leve cambio de la intensidad relativa de fluorescencia a la derecha de la línea vertical negativa), indicando el tropismo de los viriones para las células que llevan el receptor ecotrópico o anfotrópico, aunque con menor grado cuando se compara con CEE+ de tipo salvaje o CAE.

La afinidad de unión conferida de los viriones dirigidos a colágeno ECB-CEE+.CAE para las matrices de colágeno se evaluó en comparación con los viriones de tipo salvaje CAE, utilizando una modificación de las técnicas estándar ELISA y un anticuerpo monoclonal de rata, 83A25, contra el terminal-C de la proteína de envoltura gp70 (Hall y col., Human Gene Therapy, Vol. 8, páginas 2173-2182 (1997)). 1 x 10^6 cfu/ml de cada uno de los vectores ECB-CEE+.CAE o CAE de tipo salvaje se incubó en placas recubiertas de colágeno de Tipo I durante 30 minutos, seguido de lavados copiosos con PBS. Los viriones dirigidos a colágeno, ECB-CEE+.CAE, tal como se muestra en la Figura 10, siguieron unidos al colágeno (material de coloración oscura) a su lavado con PBS, mientras que los viriones que llevan CAE de tipo salvaje fueron eliminados. Cuando se colocaron en placas en pocillos de plástico norecubiertas, los viriones dirigidos a colágeno se eliminaron por lavado.

En los experimentos duplicados, 50 μl del vector ECB-CEE+.CAE o del vector CAE (teniendo cada uno una concentración de 1 x 10^5 cfu/ml) se infiltraron en la arteria carótida común izquierda de ratones inmediatamente después de la lesión por catéter de balón. Después de 48 horas, se mataron los animales y se aislaron las arterias tratadas. Las secciones de tejido congelado se colorearon con la tinción X-gal en cuanto a la presencia de β-galactosidasa dirigida nuclearmente y se aplicó la coloración de contraste Siris roja. No se observó ninguna actividad endógena de β-galactosidasa durante el procedimiento de coloración de cuatro horas en las arterias no tratadas. La Figura 11 muestra la transducción aparente de las células intimales (que tienen núcleos con coloración oscura) en los segmentos arteriales lesionados que fueron tratados con el vector ECB-CEE+.CAE dirigido a colágeno. Por contraste, no se observó ninguna evidencia de transducción con el vector CAE de tipo salvaje a la valoración viral utilizada.

Se añadió el vector ECB-CEE+.CAE o el vector CAE de tipo salvaje, cada uno a una concentración de 2 x 10^6 cfu/ml, a los segmentos de la vena safena humana lesionada en cultivo orgánico. La Figura 12 muestra la transducción mínima (4%) de las células musculares lisas proliferantes en el segmento venoso lesionado transducido con el vector anfotrópico CAE de tipo salvaje. Por contraste, se observó la transducción mejorada (38%) de las células musculares lisas proliferantes en el segmento transducido con el vector ECB-CEE+.CAE dirigido a colágeno. La eficacia de transducción ha sido expresada como porcentaje de células con núcleos de coloración oscura a su coloración con X-gal.

Ejemplo 4

Los tipos I y III de colágeno, así como los tipos V y VI, se expresan en regiones que rodean las placas ateroscleróticas (Van Zantan y col., J. Clin. Invest., Vol. 93, páginas 615-632 (1994)). La expresión de los colágenos de tipo I y tipo III es responsable de la trombogenicidad característica, es decir, la reactividad a las plaquetas asociadas al Factor von Willebrand. Por tanto, se obtuvieron como desechos quirúrgicos placas ateroscleróticas humanas procedentes de endarterectomías. Se lavaron las placas con una solución salina fisiológica para eliminar los elementos sanguíneos. Se colocaron luego las placas en placas Petri de plástico de 100 mm que contenían 5 ml de proteína de envoltura quimérica SU-ECB-CEE+ o tampón durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los especímenes tratados y no tratados se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, y se fijaron las secciones de criostato en acetona para su coloración inmunohistoquímica para detectar la proteína de envoltura quimérica unida a colágeno (Evans y col., 1990).

Como se muestra en la Figura 13, la proteína de envoltura dirigida a colágeno se unió específicamente al reborde de las placas. Por tanto, el suministro dirigido de genes terapéuticos a células en estos lugares por los viriones dirigidos a colágeno podría ser de considerable utilidad terapéutica en el tratamiento de la aterosclerosis.

REIVINDICACIONES

1. Partícula de vector que tiene una proteína superficial viral modificada para dirigir la partícula del vector hacia un componente de la matriz extracelular, **caracterizado** porque dicha proteína superficial viral es modificada para incluir un polipéptido de marcado que incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular, **caracterizado** porque dicha partícula del vector es una partícula de vector retroviral, la proteína superficial viral modificada es una envoltura retroviral modificada y dicho componente de la matriz extracelular es colágeno.

2. Partícula de vector retroviral según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicha envoltura retroviral incluye una región de unión al receptor, **caracterizada** porque dicha región de unión al receptor es modificada para incluir un polipéptido de marcado que incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular.

3. Vector retroviral según la reivindicación 2, **caracterizado** porque antes de la modificación, la región de unión al receptor de dicha envoltura tiene la secuencia SEQ ID NO:1 y en el polipéptido modificado se inserta el polipéptido de marcado entre los residuos aminoácidos 18 y 19 de la SEQ ID NO:1.

4. Vector retroviral según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha región de unión que se une al colágeno tiene la siguiente estructura:

Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Ser.

5. Partícula de vector retroviral según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque dicha partícula de vector retroviral incluye una primera envoltura retroviral y una segunda envoltura retroviral, **caracterizada** porque cada una de dicha primera envoltura retroviral y dicha segunda envoltura retroviral incluye (i) una región de unión al receptor; (ii) una región de poliprolina hipervariable; y (iii) una parte del cuerpo; y **caracterizada** porque dicha primera envoltura retroviral está exenta de péptidos no retrovirales y dicha segunda envoltura retroviral es una envoltura retroviral modificada **caracterizada** porque dicho polipéptido de marcado está insertado entre dos residuos aminoácidos contiguos de dicha segunda envoltura retroviral.

6. Partícula de vector retroviral según la reivindicación 5, **caracterizada** porque dicho polipéptido de marcado está insertado entre dos residuos aminoácidos numerados consecutivamente de la región de unión al receptor de dicha segunda envoltura retroviral.

7. Partícula de vector retroviral según la reivindicación 6, **caracterizada** porque, antes de la modificación, la región de unión al receptor de dicha segunda envoltura retroviral tiene la secuencia SEQ ID NO:1 y dicho polipéptido de marcado está insertado entre los residuos aminoácidos 18 y 19 de SEQ ID NO: 1.

8. Polinucleótido modificado que codifica una proteína de superficie viral modificada para dirigir un vector hacia un componente de la matriz extracelular, **caracterizado** porque el polinucleótido modificado incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de marcado, incluyendo dicho polipéptido de marcado una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular, **caracterizado** porque dicho polinucleótido modificado codifica un polipéptido modificado de la envoltura retroviral y dicho componente de la matriz extracelular es colágeno.

9. Polinucleótido modificado según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho polipéptido de la envoltura retroviral incluye una región de unión al receptor, **caracterizado** porque, en el polinucleótido modificado, el polinucleótido que codifica la región de unión al receptor es modificado para incluir un polinucleótido que codifica un polipéptido de marcado que incluye una región de unión que se une al componente de la matriz extracelular.

10. Polinucleótido modificado según la reivindicación 9, **caracterizado** porque, antes de la modificación, el polinucleótido que codifica la región de unión al receptor codifica una región de unión al receptor que tiene la secuencia SEQ ID NO:1 y, en el polinucleótido modificado, dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido de marcado está insertado entre el codón que codifica el residuo aminoácido 18 y el codón que codifica el residuo aminoácido 19.

11. Célula productora para producir una partícula de vector retroviral que contiene un polipéptido de envoltura modificado, incluyendo dicha célula productora el polinucleótido modificado según la reivindicación 8.

12. Partícula de vector retroviral según la reivindicación 1, que incluye además al menos un polinucleótido que codifica un agente terapéutico.

13. Utilización de la partícula de vector retroviral según la reivindicación 12 para preparar una composición útil para la terapia genética.

14. Polipéptido de envoltura retroviral modificado **caracterizado** porque, antes de la modificación, la envoltura incluye un polipéptido que tiene la secuencia SEQ ID NO:1 y **caracterizado** porque, en la envoltura modificada, un polipéptido de marcado que incluye una región de unión que se une a un componente de la matriz extracelular está insertado entre el residuo aminoácido 18 y el residuo aminoácido 19 de SEQ ID NO:1, **caracterizado** porque dicha región de unión se une al colágeno.

15. Polipéptido según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha región de unión que se une al colágeno tiene la siguiente estructura:

Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Ser.

16. Vector de plásmido retroviral que incluye el polinucleótido modificado según la reivindicación 8.

17. Procedimiento para generar partículas de vector retroviral, que comprende:

(a) la transfección de una línea celular seleccionada de entre el grupo compuesto de (i) una línea celular pre-empaquetadora que incluye polinucleótidos que codifican las proteínas retrovirales gag y pol, y (ii) una línea celular empaquetadora que incluye polinucleótidos que codifican las proteínas retrovirales gag, pol y env con el vector plásmido retroviral según la reivindicación 16 para formar una línea celular productora; y

(b) el cultivo de dicha línea celular productora para generar partículas de vector retroviral.

FIG. 1A

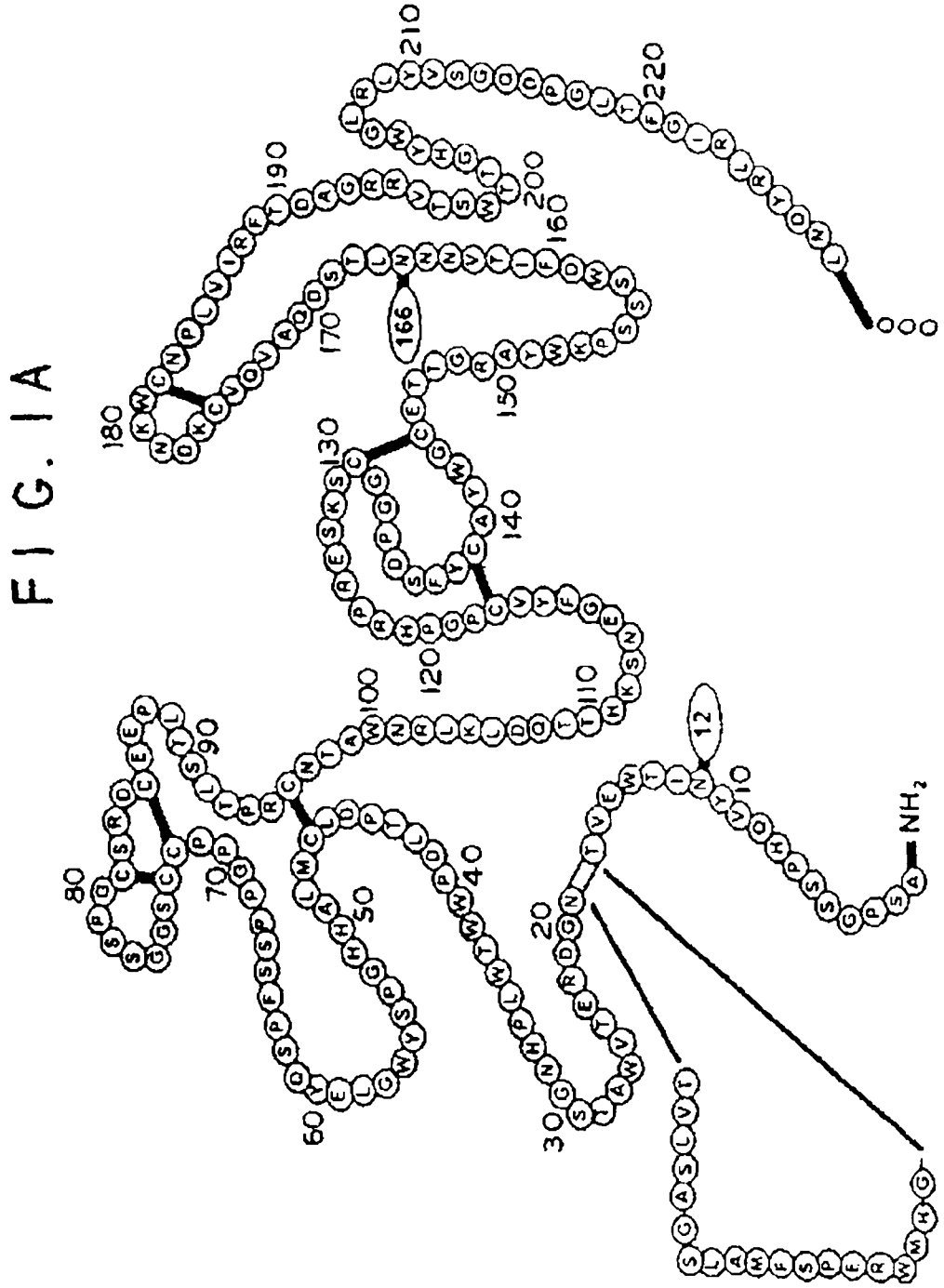


FIG. 1B

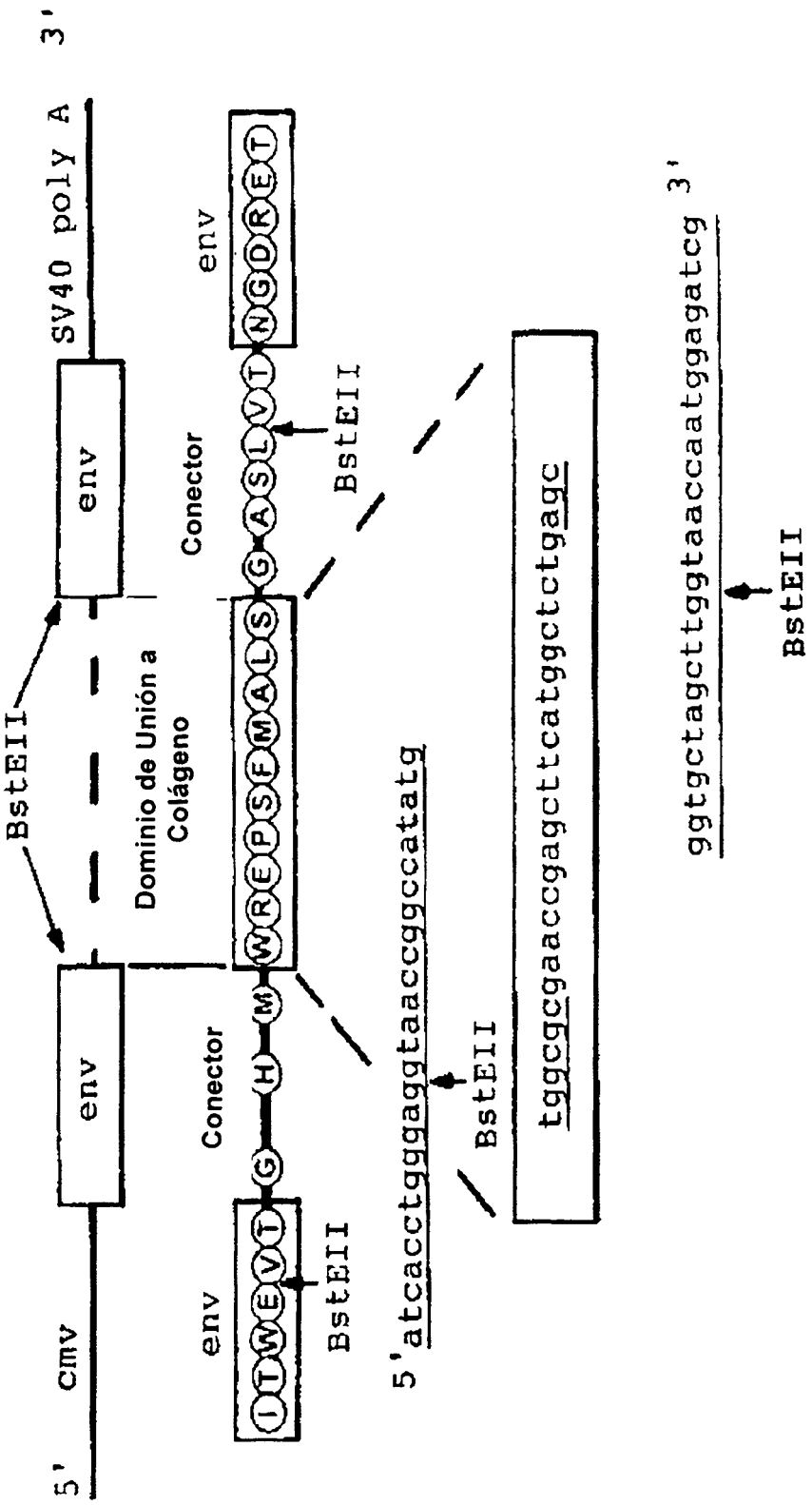

5'
cmv
env
BstEII
Dominio de Unión a Colágeno
env
SV40 poly A
3'
env
I T W E V T
BstEII
G
Conector
H
M
W R E P S F M A L S
G
Conector
A S L V T
BstEII
N G D R E T
env
5'atcacctgggaggtaaccggccatatg
BstEII
tggcgcgaaccgagcttcatggctctgagc
ggtgctagcttggtaaccaatggagatcg
3'
BstEII

FIG. 2A

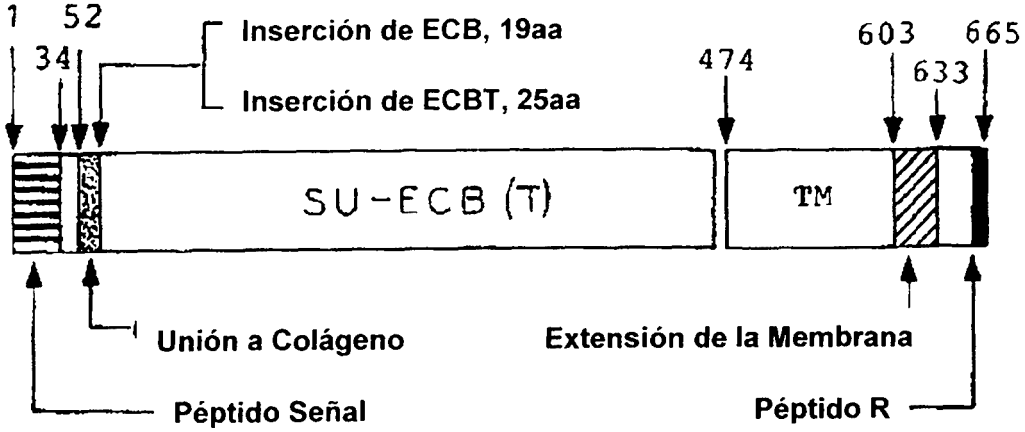

1
52
34
Inserción de ECB, 19aa
Inserción de ECBT, 25aa
474
603
633
665
SU-ECB (T)
TM
Unión a Colágeno
Extensión de la Membrana
Péptido Señal
Péptido R

FIG. 2B

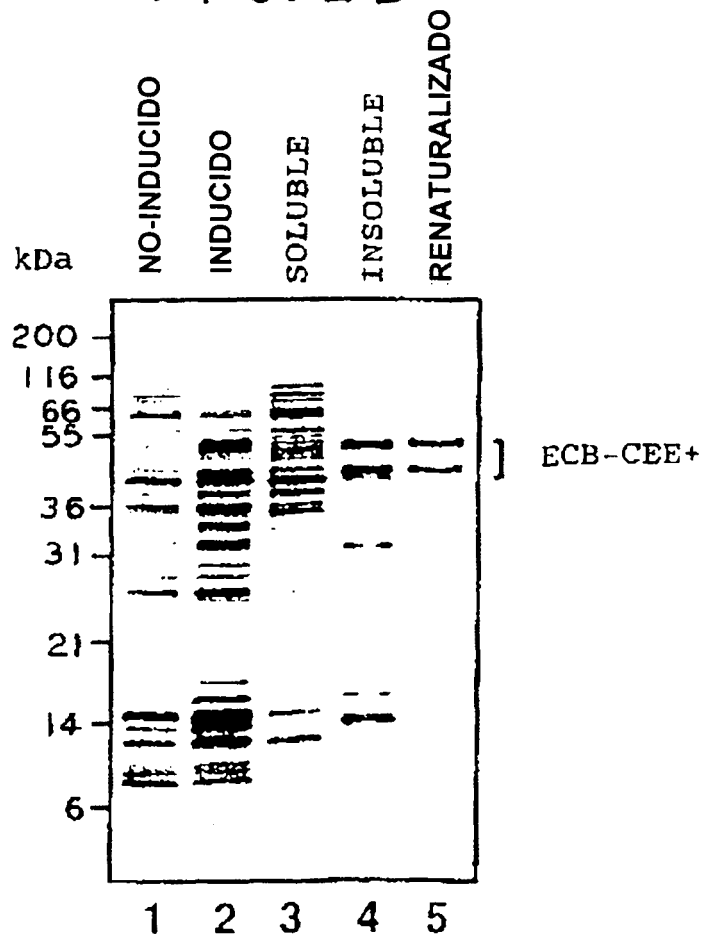

kDa
NO-INDUCIDO
INDUCIDO
SOLUBLE
INSOLUBLE
RENATURALIZADO
200
116
66
55
36
31
21
14
6
ECB-CEE+
1
2
3
4
5

FIG. 2C

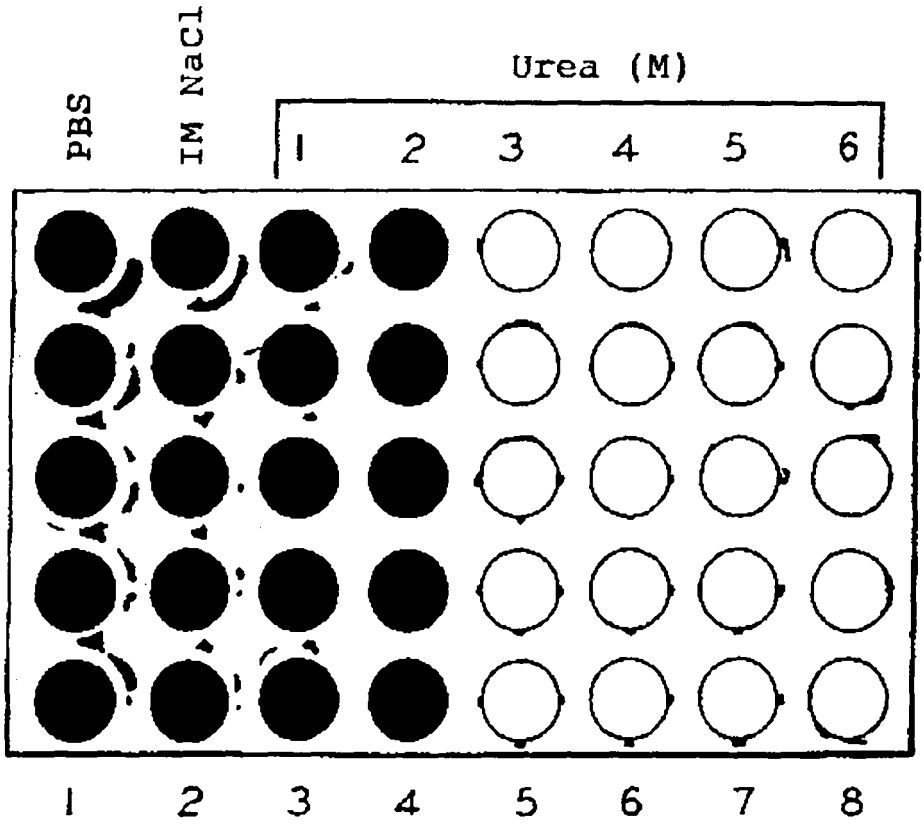




FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C

FIG. 3D

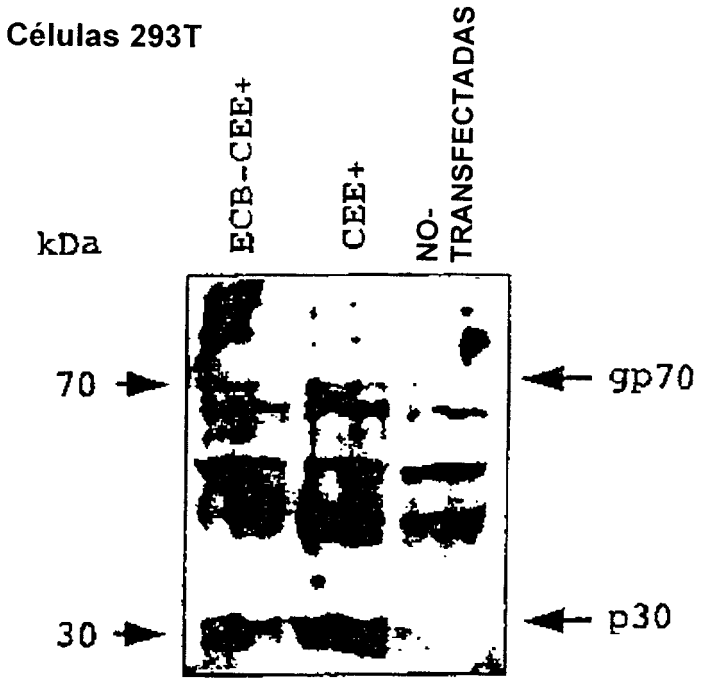

Células 293T
ECB-CEE+
CEE+
NO-TRANSFECTADAS
kDa
70
30
gp70
p30

FIG. 3E

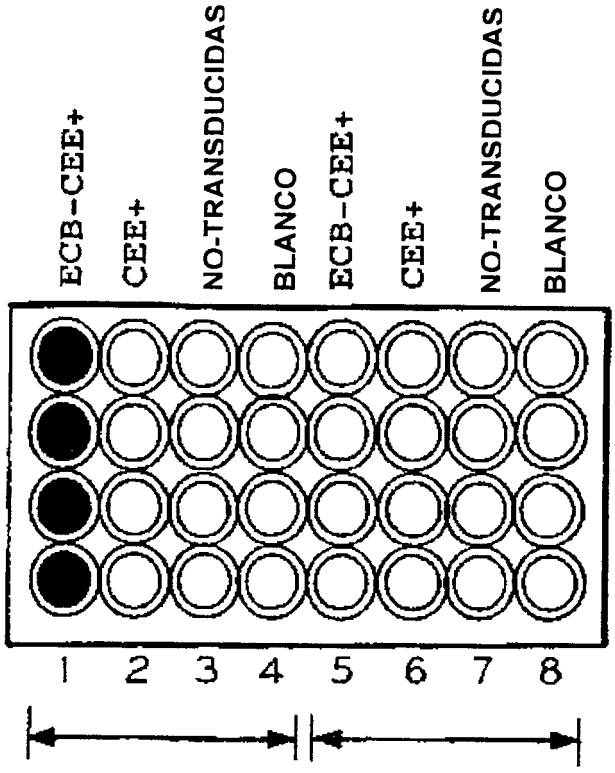

ECB-CEE+
CEE+
NO-TRANSDUCIDAS
BLANCO
ECB-CEE+
CEE+
NO-TRANSDUCIDAS
BLANCO
1 2 3 4 5 6 7 8

FIG. 4A

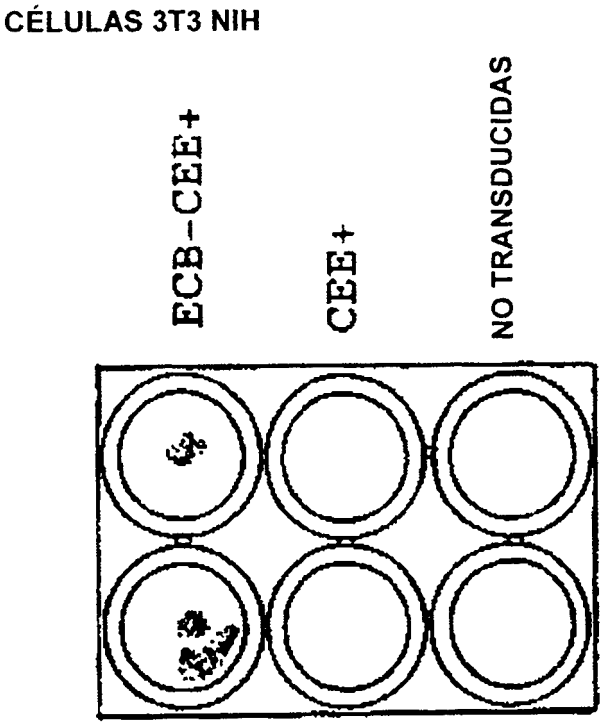


FIG. 4B

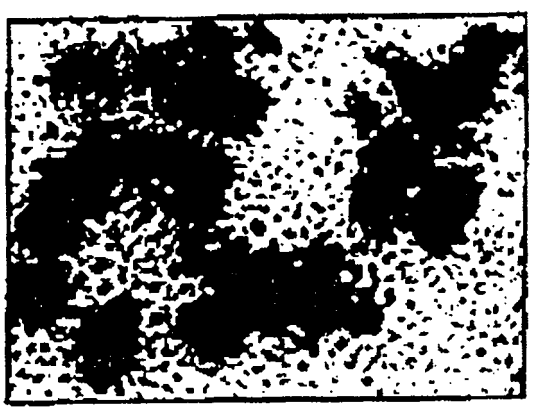


FIG. 4C

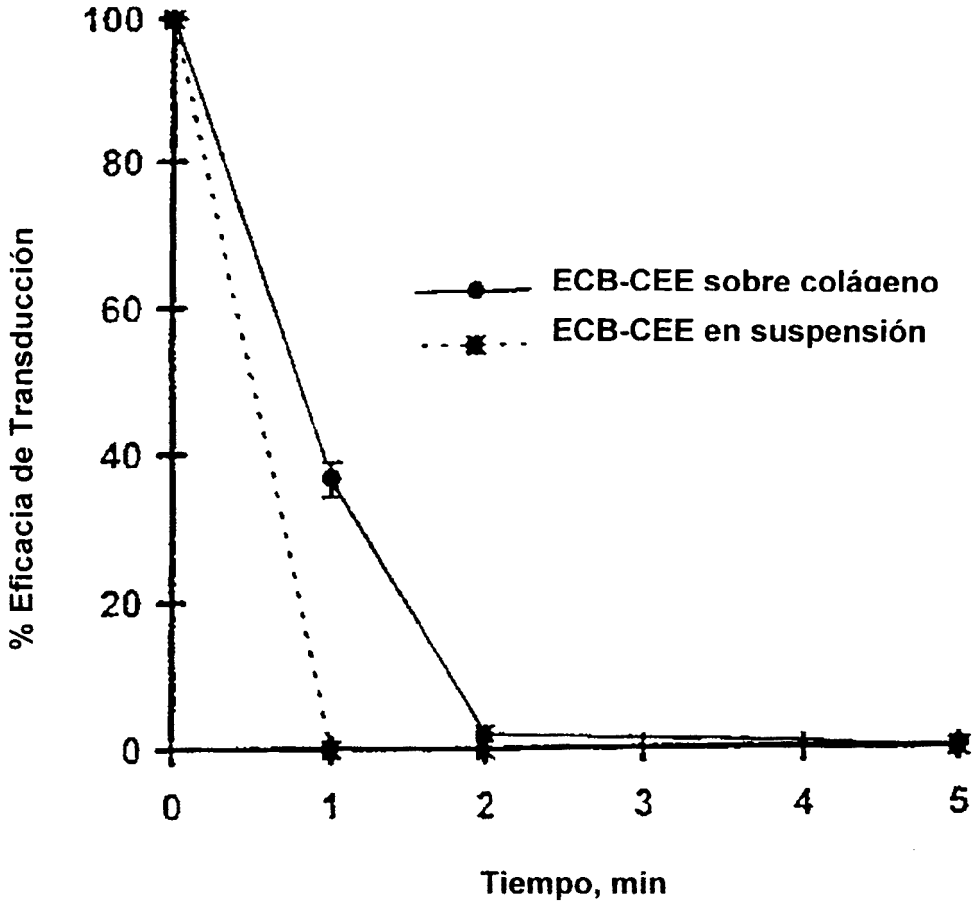

100
80
60
40
20
0
% Eficacia de Transducción
0
1
2
3
4
5
Tiempo, min
ECB-CEE sobre colágeno
ECB-CEE en suspensión

FIG. 5

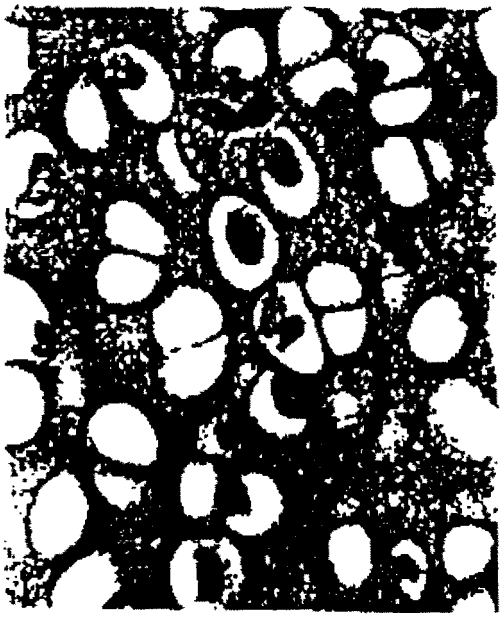


FIG. 7

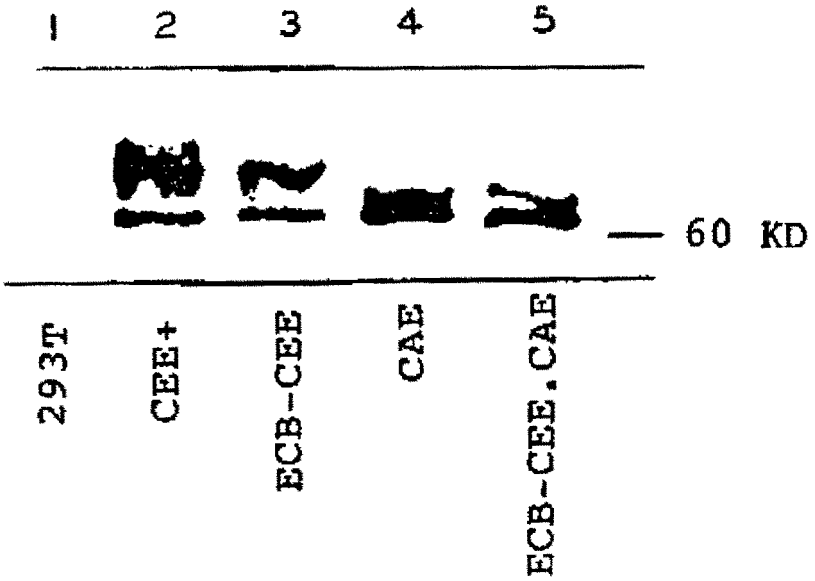


FIG. 5A



FIG. 5B



FIG. 5C

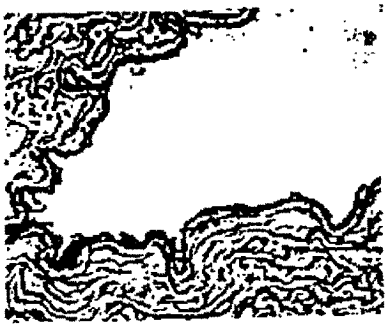


FIG. 5D

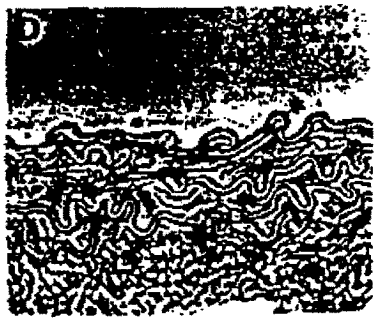


FIG. 5E



FIG. 6A



FIG. 6B

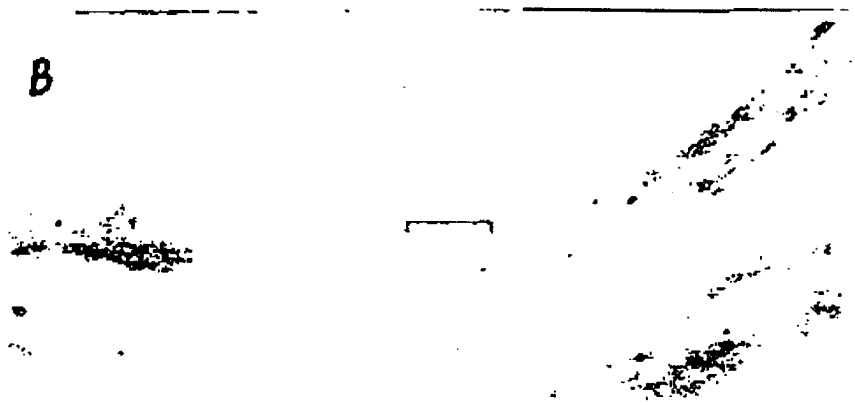


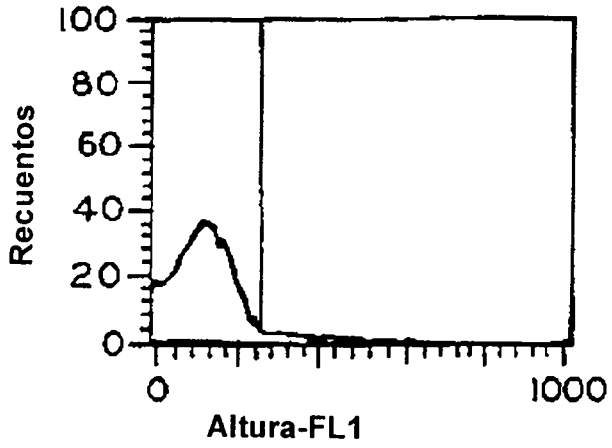
FIG. 6C



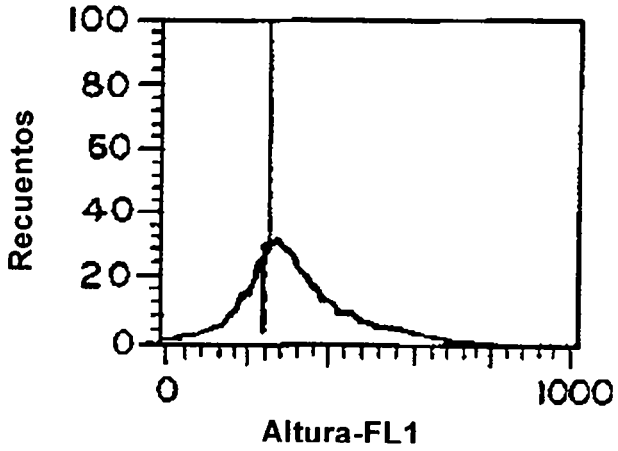
Intensidad Relativa de Fluorescencia

FIG. 8A

293T



CEE+



ECB-CEE+

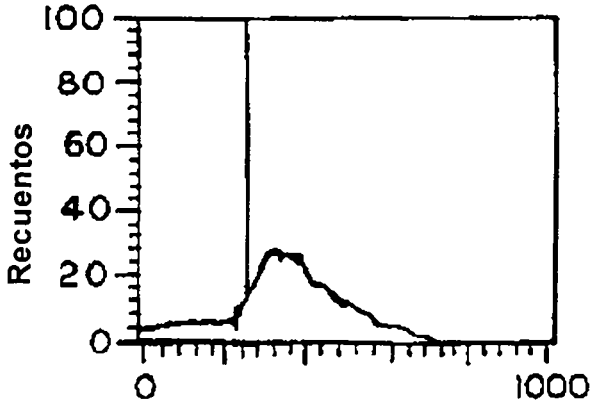
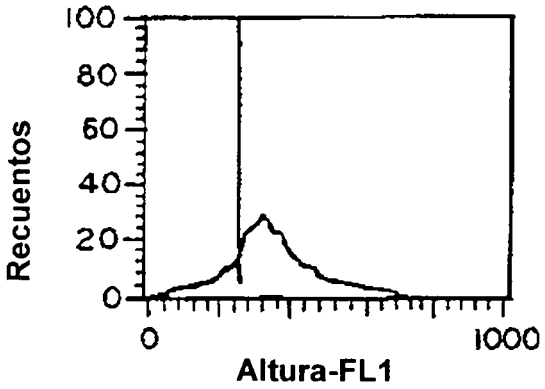


FIG. 8B

CAE



ECB-CEE+ CAE

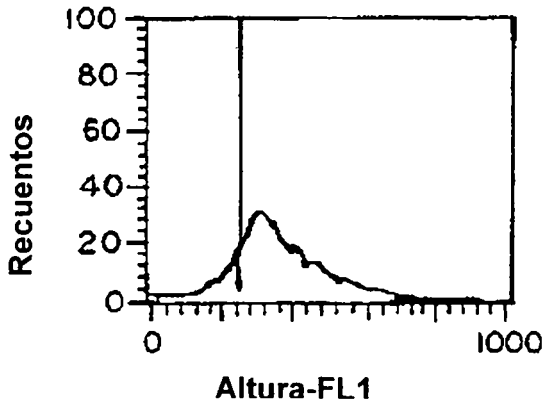


FIG. 9A

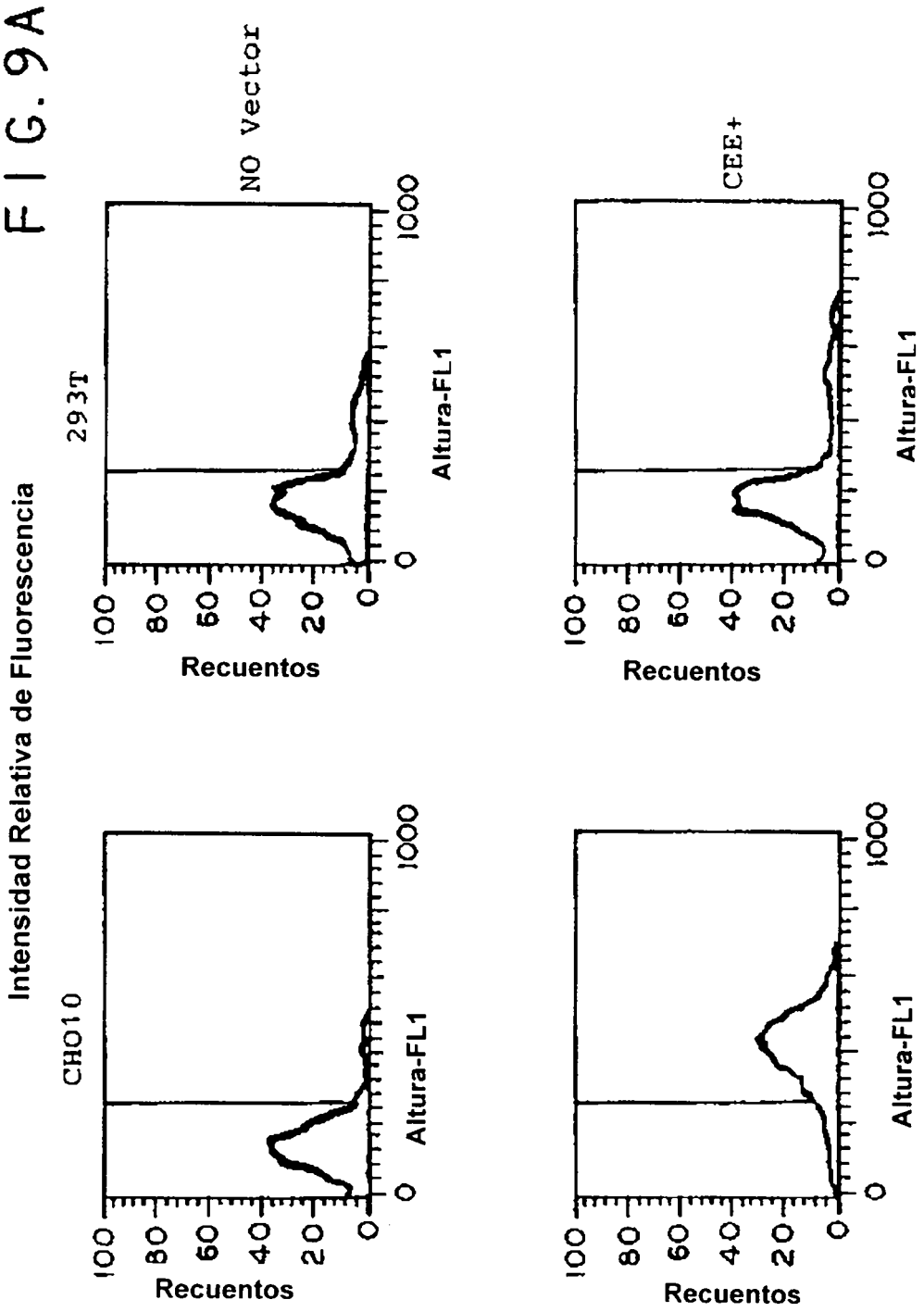

Intensidad Relativa de Fluorescencia
293T
NO Vector
CHO10
CEE+
Recuentos
Altura-FL1
0
20
40
60
80
100
1000

FIG. 9B

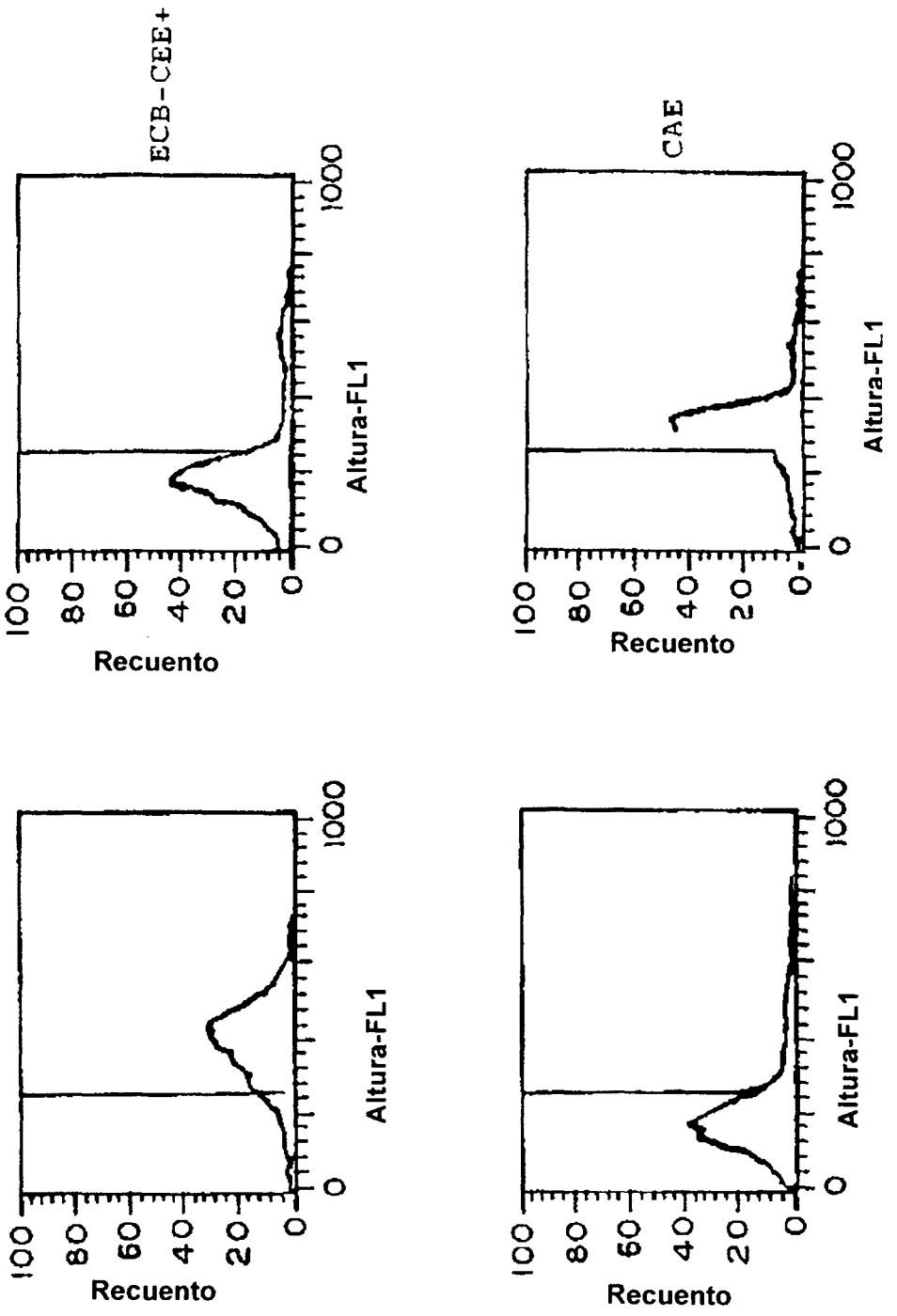


FIG. 9C

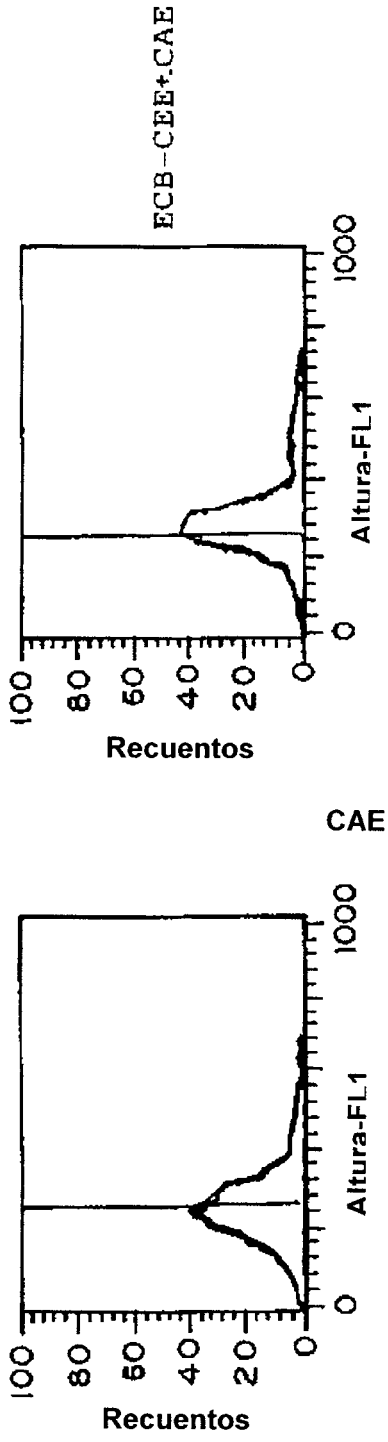

ECB-CEE+.CAE
1000
0
Altura-FL1
100
80
60
40
20
0
Recuentos
1000
0
Altura-FL1
100
80
60
40
20
0
Recuentos

FIG. 10

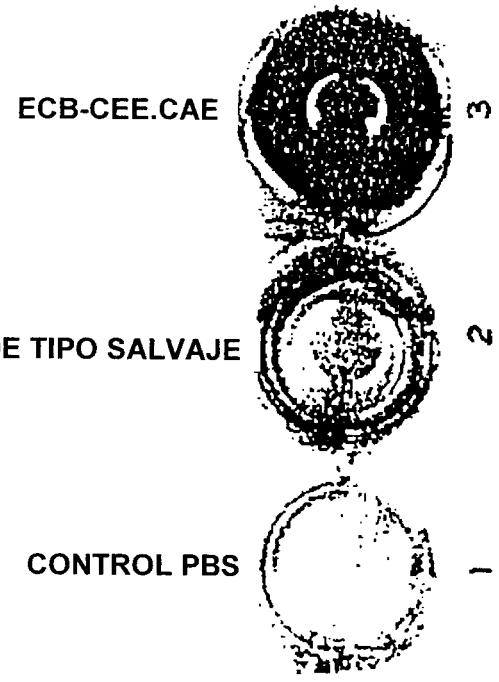

ECB-CEE.CAE
3
CAE DE TIPO SALVAJE
2
CONTROL PBS
1

FIG. 11A

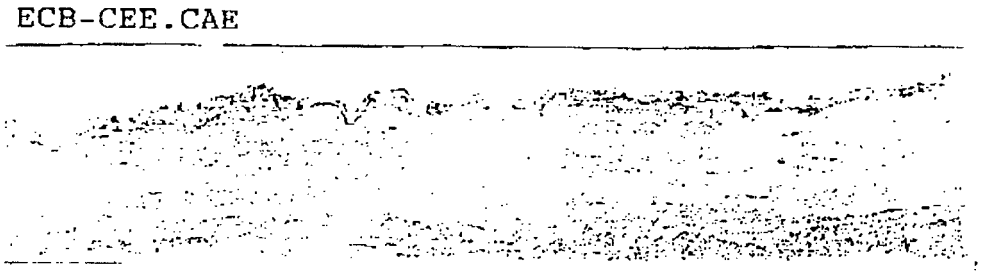


FIG. 11B

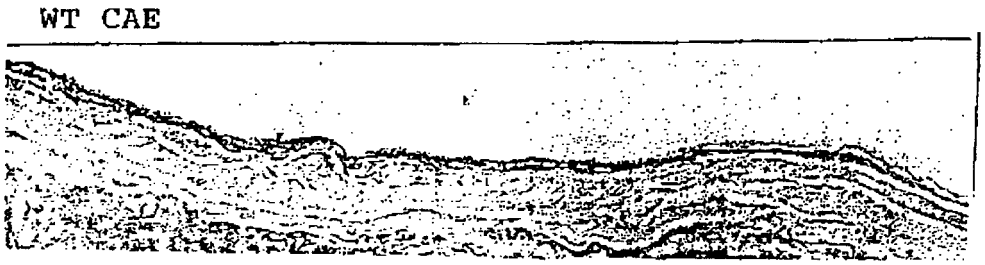


FIG. 12A

WT CAE

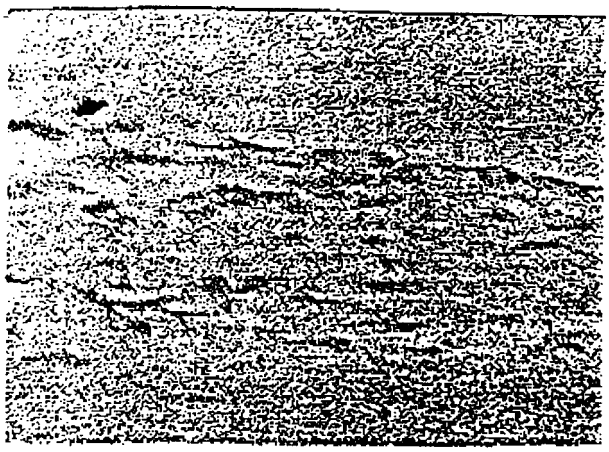


FIG. 12B

ECB-CEE.CAE

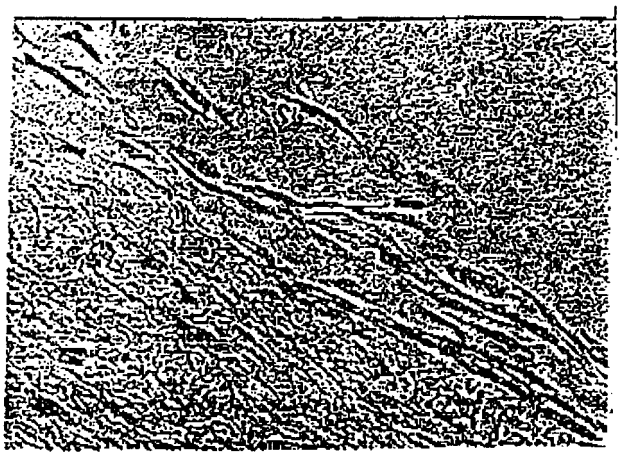


FIG. 13A

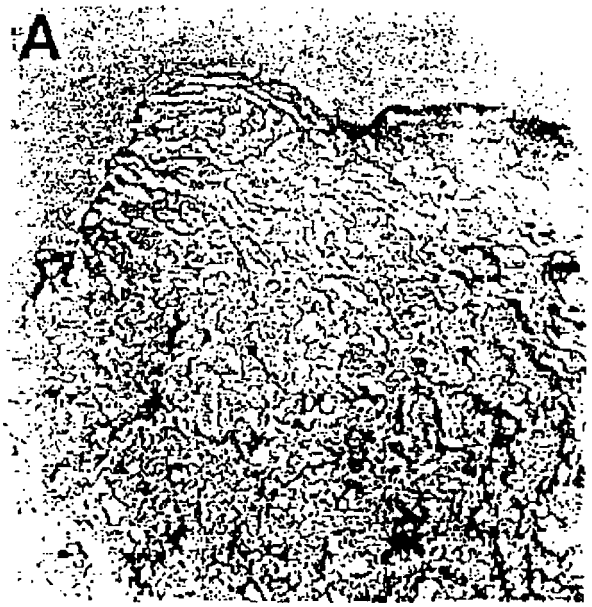
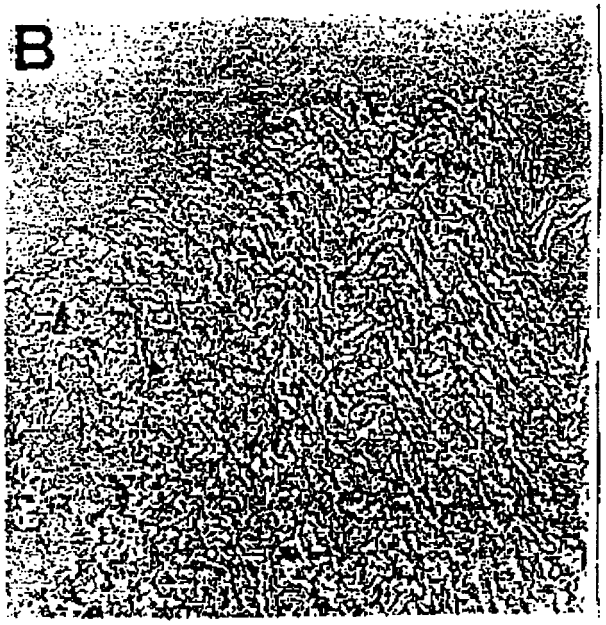


FIG. 13B



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) Solicitante: Hall, Frederick L.
Gordon, Erlinda M.
Anderson, W. French
Starnes, Vaughn A.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Polipéptidos Retrovirales Modificados de Envoltura para Unión a Componentes de la Matriz Extracelular.

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 3

(iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINATARIO: Carella, Byrne, Bain, Gilfillan, Cecchi; Stewart & Olstein
(B) CALLE: 6 Becker Farm Road
(C) CIUDAD: Roseland
(D) ESTADO: New Jersey
(E) PAÍS: USA
(F) CÓDIGO POSTAL: 07068

(v) FORMATO LEGIBLE DEL ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: disquette de 3,5 pulgadas
(B) ORDENADOR: IBM PS/S
(C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS
(D) SOFTWARE: Word Perfect 5.1

(vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
(A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS ANTERIORES SOBRE LA SOLICITUD:
(A) NÚMERO DE SOLITIDU: 08/837.223
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 10 de abril de 1997

(viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:
(A) NOMBRE: Olstein, Elliot M.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 24.025
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 271010-419

(ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:
(A) TELÉFONO: 201-994-1700
(B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 229 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácidos
(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: polipéptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Región de unión a receptor de la proteína gp70 ecotrópica.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

Ala Ser Pro Gly Ser Ser Pro
5

His Gln Val Tyr Asn Ile Thr Trp Glu Val
10 15

Thr Asn Gly Asp Arg Glu Thr Val Trp Ala
20 25

Thr Ser Gly Asn His Pro Leu Trp Thr Trp
30 35

Trp Pro Asp Leu Thr Pro Asp Leu Cys Met
40 45

Leu Ala His His Gly Pro Ser Tyr Trp Gly
50 55

Leu Glu Tyr Gln Ser Pro Phe Ser Ser Pro
60 65

Pro Gly Pro Pro Cys Cys Ser Gly Gly Ser
70 75

Ser Pro Gly Cys Ser Arg Asp Cys Glu Glu
80 85

Pro Leu Thr Ser Leu Thr Pro Arg Cys Asn
90 95

Thr Ala Trp Asn Arg Leu Lys Leu Asp Gln
100 105

Thr Thr His Lys Ser Asn Glu Gly Phe Tyr
110 115

Val Cys Pro Gly Pro His Arg Pro Arg Glu
120 125

Ser Lys Ser Cys Gly Gly Pro Asp Ser Phe
130 135

Tyr Cys Ala Tyr Trp Gly Cys Glu Thr Thr
140 145

Gly Arg Ala Tyr Trp Lys Pro Ser Ser Ser
150 155

Trp Asp Phe Ile Thr Val Asn Asn Asn Leu
160 165

Thr Ser Asp Gln Ala Val Gln Val Cys Lys
170 175

Asp Asn Lys Trp Cys Asn Pro Leu Val Ile
180 185

Arg Phe Thr Asp Ala Gly Arg Arg Val Thr
190 195

Ser Trp Thr Thr Gly His Tyr Trp Gly Leu
200 205

Arg Leu Tyr Val Ser Gly Gln Asp Pro Gly
210 215
Leu Thr Phe Gly Ile Arg Leu Arg Tyr Gln
220 225
Asn Leu

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 687 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: única
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: polinucleótido

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOMBRE/CLAVE: Polinucleótido que codifica la región de unión a receptor de la proteína gp70 ecotrópica.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

GCTTCGCCCG GCTCCAGTCC TCATCAAGTC TATAATATCA CCTGGGAGGT AACCAATGGA
60
GATCGGGAGA CGGTATGGGC AACTTCTGGC AACCACCCTC TGTGGACCTG GTGGCCTGAC
120
CTTACCCCAG ATTTATGTAT GTTAGCCCAC CATGGACCAT CTTATTGGGG GCTAGAATAT
180
CAATCCCCTT TTTCTTCTCC CCCGGGGCCC CCTTGTTGCT CAGGGGGCAG CAGCCCAGGC
240
TGTTCCAGAG ACTGCGAAGA ACCTTTAACC TCCCTCACCC CTCGGTGCAA CACTGCCTGG
300
AACAGACTCA AGCTAGACCA GACAACTCAT AAATCAAATG AGGGATTTTA TGTTTGCCCC
360
GGGCCCCACC GCCCCCGAGA ATCCAAGTCA TGTGGGGGTC CAGACTCCTT CTACTGTGCC
420
TATTGGGGCT GTGAGACAAC CGGTAGAGCT TACTGGAAGC CCTCCTCATC ATGGGATTTC
480
ATCACAGTAA ACAACAATCT CACCTCTGAC CAGGCTGTCC AGGTATGCAA AGATAATAAG
540

TGGTGCAACC CCTTAGTTAT TCGGTTTACA GACGCCGGGA GACGGGTTAC TTCCTGGACC
600
ACAGGACATT ACTGGGGCTT ACGTTTGTAT GTCTCCGGAC AAGATCCAGG GCTTACATTT
660
GGGATCCGAC TCAGATACCA AAATCTA
687

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: polipéptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Dominio de unión a colágeno del Factor de von Willebrand.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

Trp Arg Glu Pro Ser Phe Met Ala Leu Ser
5 10