



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 580**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99902747 .7**

86 Fecha de presentación : **29.01.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1056878**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2000**

54

Título: **Constructos de cromosomas artificiales que contienen secuencias de ácidos nucleicos que pueden dirigir la formación de un virus recombinante.**

30

Prioridad: **26.02.1998 US 31006**

73

Titular/es: **MediGene, Inc.**
10660 Scrips Ranch Blvd., Suite 200
San Diego, California 92131, US

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

72

Inventor/es: **Horsburgh, Brian;**
Qiang, Dong;
Tufaro, Francis y
Ostrove, Jeffrey

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

74

Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 270 580 T3

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

DESCRIPCIÓN

Constructos de cromosomas artificiales que contienen secuencias de ácidos nucleicos que pueden dirigir la formación de un virus recombinante.

Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a constructos de cromosomas artificiales que contienen secuencias de ácidos nucleicos extrañas, tales como secuencias de ácidos nucleicos virales, y métodos para usar estos constructos para el tratamiento y para la producción de virus recombinantes.

Los cromosomas artificiales son vectores basados en ADN, grandes, que se han usado ampliamente en la construcción de bibliotecas de ADN para el análisis y mapeo de genomas complejos. Los cromosomas artificiales se han derivado de levaduras (cromosomas artificiales de levaduras: YAC), bacterias (cromosomas artificiales de bacterias: BAC, y cromosomas artificiales derivados de P1: PAC), y mamíferos (cromosomas artificiales de mamíferos: MAC), tal como seres humanos (cromosomas artificiales humanos: HAC). Estos vectores incluyen elementos derivados de cromosomas que son responsables de la replicación y el mantenimiento, y pueden mantener de manera estable grandes fragmentos de ADN genómico.

El virus herpes simplex (VHS) es el virus del herpes humano prototipo. A pesar del hecho de que el VHS es un patógeno humano, ha habido un gran interés en utilizar el VHS como agente terapéutico. Se ha secuenciado el genoma del VHS, y se han generado muchos mutantes de VHS y se han usado específicamente en este contexto. La generación de mutantes de VHS se ha llevado a cabo usando la selección de fármaco o mediante la cotransfección de células con ADN de plásmido, normalmente modificado mediante inserción de un gen marcador, y ADN viral intacto. Se identifican mutantes mediante selección para detectar o bien resistencia al fármaco o bien recombinación y expresión del gen marcador, o bien mediante hibridación en placas. Otro método que se ha usado para generar mutantes del virus del herpes implica el uso de juegos de cósmidos que, tomados juntos, contienen genomas del virus del herpes completos. Por ejemplo, se han creado juegos de cósmidos que contienen los genomas enteros del virus de pseudorrabia (PRV), virus Varicella-Zoster (VVZ), virus herpes simplex (VHS), citomegalovirus (CMV), y virus Epstein-Barr (VEB). Al construir genomas virales completos de estos cósmidos, se liberan las secuencias virales de las estructuras principales de los cósmidos y se transfectan dentro de las células. Se producen placas virales mediante recombinación entre los fragmentos que se solapan, que juntos representan el genoma entero. Se realizan mutaciones específicas en los genomas virales manipulando el ADN del cósmido.

Sumario de la invención

La invención proporciona constructos de cromosomas artificiales que contienen secuencias del virus herpes simplex, que dirigen la formación de un virus herpes simplex recombinante (por ejemplo, un virus lítico o no lítico) con la introducción dentro de una célula y métodos para usar estos constructos de cromosomas artificiales para el tratamiento (por ejemplo, terapia génica) y la producción recombinante de virus. Opcionalmente, el constructo de cromosoma artificial, ya sea en la parte de cromosoma artificial o en la parte de la secuencia de ácido nucleico, incluye adicionalmente una secuencia de ácido nucleico heteróloga que, por ejemplo, codifica para un producto génico terapéutico, tal como un factor del crecimiento, una hormona, un antígeno de vacuna, una citotoxina, una proteína inmunomoduladora, una molécula de ARN antisentido, o una ribozima. La parte de cromosoma artificial del constructo puede derivarse de un cromosoma artificial bacteriano, cromosoma artificial derivado de P1, un cromosoma artificial de levadura, o un cromosoma artificial de mamífero (por ejemplo, ser humano). El virus recombinante codificado por la secuencia de ácido nucleico incluido en el constructo de cromosoma artificial es un virus herpes simplex.

En otro aspecto, la invención se caracteriza por un método de producción de un virus recombinante en una célula, por ejemplo, una célula en un mamífero, en el que se introduce un constructo de cromosoma artificial tal como se describió anteriormente dentro de la célula. Este método puede implicar adicionalmente introducir dentro de la célula un amplímero que está empaquetado dentro de un virión recombinante al introducir el constructo de cromosoma artificial dentro de la célula.

La invención también proporciona un método de introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga dentro de una célula, por ejemplo, una célula en un mamífero, en el que se introduce un constructo de cromosoma artificial tal como se describió anteriormente dentro de la célula.

También se incluye en la invención un método para destruir una célula, por ejemplo, una célula en un mamífero (por ejemplo, una célula cancerígena), en el que se introduce un constructo de cromosoma artificial tal como se describió anteriormente dentro de la célula.

La invención también se caracteriza por una célula que tiene un constructo de cromosoma artificial integrado de manera estable dentro de su genoma. En un ejemplo, el constructo de cromosoma artificial incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica para un genoma de VHS en el que se muta o deleciona un gen temprano inmediato (véase más adelante). La invención también incluye métodos para preparar estas células.

La invención proporciona muchas ventajas. Por ejemplo, cuando se emplean constructos de cromosomas artificiales bacterianos en la invención, los constructos pueden propagarse de manera fácil y eficaz en bacterias. Esto es particularmente ventajoso en el caso de constructos que incluyen genes virales que serían citopáticos si se propagasen los constructos en células de mamíferos. Esto también es ventajoso en la preparación de virus recombinantes, dado que pueden usarse métodos de cultivo bacteriano a gran escala, en vez de métodos que emplean cultivos de células de mamíferos. Una ventaja adicional de la invención es que, a diferencia de los sistemas basados en cósmidos para la producción de virus (véase anteriormente), que se basan en la recombinación de varias moléculas para reconstituir un genoma viral completo, un genoma viral entero puede estar contenido en un único constructo de cromosoma artificial, proporcionando un aumento de la eficacia y la estabilidad genética. Tal como se trata adicionalmente más adelante, esto es particularmente ventajoso en el empaquetamiento *trans* de amplímeros dentro de virus recombinantes usando los métodos de la invención.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos, y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática del fragmento HindIII del plásmido BAC-TK. Los fragmentos AB y CD corresponden a los nucleótidos 47860-47150 y 47057-45582, respectivamente, del genoma de la cepa 17 de VHS-1 (números de registro de Genbank X14-112, 000317, 000374 y S40593). “H” representa sitios de restricción de HindIII, y “cm” y “tk” representan secuencias que codifican para cloramfenicol y timidina cinasa, respectivamente.

La figura 2 es un gráfico que muestra curvas de crecimiento de una etapa para VHS-BAC, r25, y r26 (véanse los resultados experimentales, más adelante).

La figura 3A es una representación esquemática de un método para llevar a cabo la mutagénesis de VHS-BAC. Brevemente, se lleva a cabo la recombinación homóloga entre VHS-BAC y un constructo que contiene (i) secuencias complementarias a UL53 (“53seq”), (ii) un gen de kanamicina (“kan”), y (iii) secuencias complementarias a UL55 (“55seq”), dando como resultado que el gen UL54, que está presente en el genoma de VHS entre los genes UL53 y UL55, se sustituya por el gen de la kanamicina.

La figura 3B es una representación esquemática de análisis mediante PCR que puede usarse para caracterizar clones en los que ha tenido lugar el acontecimiento de recombinación homóloga descrito anteriormente con respecto a la figura 3A.

La figura 4 es una fotografía de un gel que muestra los resultados de un experimento en el que se comparó la estabilidad del plásmido p25 de BAC con la estabilidad del cósmido 14 (Cunningham *et al.*, Virology 197(1):116-124, 1993).

Descripción detallada

La invención proporciona constructos de cromosomas artificiales que contienen secuencias de ácidos nucleicos del virus herpes simplex. Opcionalmente, los constructos de cromosomas artificiales también contienen secuencias de ácidos nucleicos heterólogas, es decir, secuencias de ácidos nucleicos que de manera natural no son un componente del cromosoma artificial ni de las secuencias de ácidos nucleicos virales. Los constructos de cromosomas artificiales de la invención pueden usarse en métodos para producir virus recombinantes en células *in vivo*, por ejemplo, en métodos de tratamiento (por ejemplo, métodos de terapia génica), o *in vitro*, por ejemplo, métodos de producción de virus recombinantes o en empaquetamiento de amplímeros.

Los cromosomas artificiales dentro de los cuales pueden insertarse secuencias de ácidos nucleicos extrañas para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por ejemplo, pBeloBAC11 o pBAC108L; véase, por ejemplo, Shizuya *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(18): 8794-8797, 1992; Wang *et al.*, Biotechniques 23(6): 992-994, 1997), cromosomas artificiales basados en P1 (PAC), cromosomas artificiales de levaduras (YAC; véase, por ejemplo, Burke, Genet. Anal. Tech. Appl. 7(5): 94-99, 1990), y cromosomas artificiales de mamíferos (MAC; véase, por ejemplo, Vos, Nat. Biotechnol. 15(12): 1257-1259, 1997; Ascenzioni *et al.*, Cancer Lett. 118(2): 135-142, 1997), tal como cromosomas artificiales humanos (HAC).

Las secuencias de ácidos nucleicos virales que pueden insertarse dentro de cromosomas artificiales para generar los constructos de cromosomas artificiales de la invención pueden derivarse de VHS-1 o VHS-2.

Tal como se trató anteriormente, las secuencias de ácidos nucleicos virales se incluyen en los constructos de cromosomas artificiales de la invención, de modo que los virus recombinantes se producen a partir de los constructos al introducirse dentro de células. En algunas aplicaciones de la invención, es deseable que el virus recombinante producido de esta manera de cómo resultado la destrucción de la célula. En este caso, el virus producido a partir del constructo de cromosoma artificial puede ser un virus que destruye la célula en la que se produce, por ejemplo, induciendo la lisis o apoptosis de la célula. Esto es deseable, por ejemplo, si la célula es una célula cancerígena, tal como una célula cancerígena de un tumor de tipo del sistema nervioso, por ejemplo, una célula de astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, schwannoma, neurofibrosarcoma, o meduloblastoma. Otros

tipos de células tumorales que pueden destruirse de acuerdo con la presente invención, incluyen, por ejemplo, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer gástrico, fibrosarcoma, carcinoma de células escamosas, células neuroectodérmicas, tumor de la tiroides, tumor de la hipófisis, linfoma, hepatoma, mesotelioma, y células de carcinoma epidermoide.

Otras aplicaciones terapéuticas en las que destruir la célula diana es deseable incluyen, por ejemplo, la ablación de queratinocitos y células epiteliales responsables de verrugas, la ablación de células en órganos hiperactivos (por ejemplo, la tiroides), la ablación de células adiposas en pacientes obesos, la ablación de tumores benignos (por ejemplo, tumores benignos de la tiroides o hipertrofia de próstata benigna), la ablación de células adenohipofisarias que producen la hormona del crecimiento para tratar la acromegalia, la ablación de lactotrofos para detener la producción de prolactina, la ablación de células que producen ACTH para tratar la enfermedad de Cushing, la ablación de células cromafinas que producen epinefrina de la médula suprarrenal para tratar feocromocitomas, y la ablación de células del islote beta que producen insulina par tratar insulinomas.

Este efecto puede aumentarse si el constructo de cromosoma artificial también contiene una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica para uno o más de, por ejemplo, una citotoxina, una proteína inmunomoduladora (es decir, una proteína que o bien potencia o bien suprime una respuesta inmunitaria del huésped frente a un antígeno), o un antígeno tumoral. Ejemplos de proteínas inmunomoduladoras incluyen, por ejemplo, citocinas (por ejemplo, interleucinas, por ejemplo, cualquiera de las interleucinas 1-15, interferones α , β o γ , factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)), quimocinas (por ejemplo, proteína activadora de neutrófilos (NAP), factor quimiotáctico y activador de macrófagos (MCAF), RANTES, y péptidos inflamatorios de macrófagos MIP-1a y MIP-1b), componentes complementarios y sus receptores, moléculas accesorias del sistema inmunitario (por ejemplo, B7.1 y B7.2), moléculas de adhesión (por ejemplo, ICAM-1, 2, y 3), y moléculas receptoras de adhesión. Ejemplos de antígenos tumorales que pueden producirse usando los presentes métodos incluyen, por ejemplo, los antígenos E6 y E7 del virus del papiloma humano, proteínas derivadas del VEB (Van der Bruggen *et al.*, Science 254: 1643-1647, 1991), mucinas (Livingston *et al.*, Cur. Opin. Immun. 4(5): 624-629, 1992), tales como MUC1 (Burchell *et al.*, Int. J. Cancer 44: 691-696, 1989), tirosinasa de melanoma, y MZ2-E (Van der Bruggen *et al.*, citado anteriormente). (Véase además el documento WO 94/16716 para una descripción adicional de la modificación de vectores virales para incluir genes que codifican para citocinas o antígenos del tumor.) La secuencia de ácido nucleico heteróloga puede insertarse o bien dentro de la parte del cromosoma artificial del constructo o bien dentro de la parte viral del constructo en cualquiera de estos ejemplos.

En otras aplicaciones de los métodos de la invención, es deseable que un virus recombinante, producido al introducir un constructo de cromosoma artificial de la invención dentro de una célula, no destruya la célula. Estas aplicaciones incluyen, por ejemplo, el uso de constructos de cromosomas artificiales que contienen un gen heterólogo que codifica para un producto génico terapéutico, tal como un factor de crecimiento, una hormona, un antígeno de vacuna, una molécula de ARN antisentido, o una ribozima (véase más adelante). Estas aplicaciones también incluyen el uso de constructos de cromosomas artificiales para inmunizar frente a virus codificados por la secuencia de ácido nucleico incluida en el constructo. Puede ser deseable en estas aplicaciones que el virus producido a partir del constructo de cromosoma artificial esté atenuado o mutado de modo que no se replique y/o de modo que no pueda destruir a la célula en la que se produce, por ejemplo, induciendo lisis o apoptosis a la célula. Se conocen numerosos virus mutantes apropiados que tienen esas características y pueden adaptarse fácilmente para su uso en la invención por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los vectores de Geller (patente de los EE.UU. número 5.501.979; documento WO 90/09441; Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Rockville, Maryland, número de registro ATCC 40544), Breakfield (documento EP 453.242-A1), Speck (documento WO96/04395), Preston *et al.* (documento WO 96/04394), DeLuca (patente de los EE.UU. número 5.658.724), y Martuza (patente de los EE.UU. número 5.585.096) pueden adaptarse para su uso en tales métodos. Ejemplos específicos de mutantes de VHS atenuados que pueden usarse incluyen HF (ATCC VR-260), MacIntyre (ATCC VR-539), MP (ATCC VR-735); cepas G del VHS-2 (ATCC VR-724) y MS (ATCC VR-540); así como mutantes que tienen mutaciones en uno o más de los siguientes genes: los genes tempranos inmediatos ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47 (patente de los EE.UU. número 5.658.724); genes necesarios para la replicación viral, VL9, VL5, VL42, ADN pol, y ICP8; el gen γ 34.5; el gen de la ribonucleotido reductasa; el gen VP16 (es decir, Vmw65, documento WO 91/02788; documento WO 96/04395; documento WO 96/04394); y los genes gH, gL, gD o gB (documentos WO 92/05263, 94/21807, 94/03207).

Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente un producto terapéutico apropiado para que se codifique por una secuencia de ácido nucleico heteróloga incluida en este tipo de constructo de cromosoma artificial (es decir, un constructo que da como resultado la producción de un virus no lítico al introducirlo en una célula), dependiendo del resultado deseado. Por ejemplo, el producto génico heterólogo puede ser una proteína, tal como un factor de crecimiento (por ejemplo, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), VGF, o VEGF), una enzima, una hormona, o un antígeno de vacuna. Ejemplos específicos de productos génicos de proteínas que pueden producirse en la invención incluyen, por ejemplo, tirosina hidroxilasa 1, 2, ó 3, que puede usarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; factor de crecimiento nervioso (NGF, por ejemplo, la subunidad β de NGF), que puede usarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa, que puede usarse en el tratamiento de la enfermedad de Lesch-Nyhan; cadena α de β -hexosaminidasa, que puede usarse en el tratamiento de enfermedades de Tay-Sachs y Sandhoff; gen nef del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que puede usarse en el tratamiento de los síntomas neurológicos del VIH, e insulina, que puede usarse en el tratamiento de diabetes. Otros productos génicos de proteínas que pueden producirse usando los métodos de la invención

incluyen, por ejemplo, enzimas de transducción de señales, por ejemplo, proteína cinasa C; factores de transcripción, por ejemplo, c-fos, NF- κ B; oncogenes, por ejemplo, erbB, erbB-2/neu, y ras; receptores de neurotransmisores, por ejemplo, receptor de glutamato, receptor de la dopamina, y receptor de la adenosina desaminasa (documento WO 92/10564, documento WO 89/12109, documento EP 0 420 911); y la proteína de fibrosis cística (documento WO 91/02796, documento WO 92/05273, y documento WO 94/12649).

El producto terapéutico también puede ser una molécula de ARN, tal como una molécula de ARN antisentido que, mediante interacciones de hibridación, puede usarse para bloquear la expresión de un ARNm patógeno o celular. Alternativamente, la molécula de ARN puede ser una ribozima (por ejemplo, una ribozima tipo "hammerhead" ("ca-
beza-martillo") o tipo "hairpin" ("horquilla") diseñada o bien para reparar un ARN celular defectuoso, o bien para destruir un ARN codificado por patógeno o célula no deseado (véase, por ejemplo, Sullenger, *Chem. Biol.* 2(5): 249-253, 1995; Czubayko *et al.*, *Gene Ther.* 4(9): 943-949, 1997; Rossi, *Ciba Found. Symp.* 209: 195-204, 1997; James *et al.*, *Blood* 91(2): 371-382, 1998; Sullenger, *Cytokines Mol. Ther.* 2(3): 201-205, 1996; Hampel, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Bio.* 58: 1-39, 1998; Curcio *et al.*, *Pharmacol. Ther.* 74(3): 317-332, 1997).

Los componentes de los constructos de cromosomas artificiales de la invención pueden montarse usando métodos habituales. Por ejemplo, tal como se describe más adelante, puede insertarse una secuencia viral dentro de un cromosoma artificial mediante la cotransfección de las células con (i) un constructo que contiene el cromosoma artificial, flanqueado por secuencias homólogas a las regiones del genoma viral, y (ii) el genoma viral, de modo que tiene lugar la recombinación en las células, dando como resultado la producción de un virus recombinante que incluye cromosoma artificial. Además, tal como se describe más adelante, pueden aislarse moléculas de ADN recombinante a partir de células que se ha cotransfectado un constructo de cromosoma artificial y secuencias de ácidos nucleicos virales, conduciendo a la producción de un virus recombinante mediante recombinación homóloga, y la molécula de ADN aislada puede manipularse para insertar o delecionar un gen, según se desee. También pueden usarse métodos de clonación directa, que emplean sitios únicos en el genoma viral y el cromosoma artificial, para montar los componentes de los constructos de cromosomas artificiales de la invención.

La ubicación dentro de un cromosoma artificial dentro del cual se insertan secuencias de ácidos nucleicos virales o heterólogas variará dependiendo, por ejemplo, de si se desea la alteración de una función viral particular. Por ejemplo, si se desea que el constructo de cromosoma artificial incluya secuencias virales que no conduzcan a la producción de virus replicables en las células (véase anteriormente), entonces el cromosoma artificial y las secuencias virales pueden combinarse de modo que se altere una secuencia de ácido nucleico que es esencial para la replicación viral. De manera similar, puede usarse la inserción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga para alterar un gen viral esencial. Ejemplos de genes esenciales en VHS, por ejemplo, se describieron anteriormente.

Alternativamente, puede ser deseable hacer que el constructo de cromosoma artificial incluya secuencias virales que conducirán a la producción de un virus replicable en las células (véase anteriormente). En este caso, la recombinación entre el cromosoma artificial y la secuencia de ácido nucleico viral para generar un constructo de cromosoma artificial (o la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga) puede llevarse a cabo en una región no esencial del genoma del virus. Por ejemplo, una inserción de este tipo puede ser en el gen de la timidina cinasa (UL23, véase más adelante; esta inserción puede realizarse sola o en combinación con otra inserción), en uno cualquiera o más de los siguientes genes: RL1, RL2 (es decir, IE110), el locus que codifica para los transcritos asociados a la latencia, UL2 (el gen de la uracilo-ADN glucosilasa), UL3, UL4, UL10, UL11, UL13, UL16, UL20, UL24, UL40 (la pequeña subunidad de la ribonucleótido reductasa), UL41 (factor de inhibición del huésped virión ("virion host shutoff factor"), UL43, UL44, UL45, UL46, UL47, UL50, UL55, UL56, US1 (IE68), US2, US3 (el gen de la proteína cinasa), US4 (el gen de la glucoproteína G), US5, US7 (el gen de la glucoproteína I), US8 (el gen de la glucoproteína E), US9, US10, US11, y US12 (IE12), o en una secuencia intergénica.

Puede insertarse una secuencia de ácido nucleico heteróloga dentro de un constructo de cromosoma artificial en una ubicación que hace que esté bajo el control de una secuencia reguladora del cromosoma artificial o secuencias de ácido nucleico viral. Alternativamente, la secuencia de ácido nucleico heteróloga puede insertarse como parte de un casete de expresión que incluye elementos reguladores, tales como promotores o potenciadores (enhancers). Los elementos reguladores apropiados pueden seleccionarse por un experto habitual en la técnica basándose, por ejemplo, en el nivel de expresión y la especificidad del tejido deseados. Por ejemplo, puede utilizarse un promotor específico de tumor o específico del tipo de célula para limitar la expresión de un producto génico a un tipo de célula específico. Esto es particularmente útil, por ejemplo, cuando se está produciendo un producto génico antigénico tumoral, inmunomodulador o citotóxico en una célula tumoral con el fin de facilitar su destrucción. Además de utilizar promotores específicos de tejido, la administración local de un constructo de cromosoma artificial puede dar como resultado la expresión localizada.

Ejemplos de promotores no específicos de tejido que pueden utilizarse en la invención incluyen el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) (patente de los EE.UU. número 4.168.062) y el promotor del virus del sarcoma de Rous (Norton *et al.*, *Molec. Célula Biol.* 5: 281, 1985). Además, pueden utilizarse promotores del VHS, tales como los promotores IE y IE 4/5 de VHS-1.

Ejemplos de promotores específicos de tejido que pueden utilizarse en la invención incluyen, por ejemplo, el promotor de desmina, que es específico de las células musculares (Li *et al.*, *Gene* 78: 243, 1989; Li *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266: 6562, 1991; Li *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 10403, 1993); el promotor de la enolasa, que es específico

para neuronas (Forss-Petter *et al.*, J. Neuroscience Res. 16(1): 141-156, 1986); el promotor de la β -globina, que es específico para las células eritroides (Townes *et al.*, EMBO J. 4: 1715, 1985); el promotor de la tau-globina, que también es específico para las células eritroides (Brinster *et al.*, Nature 283: 499, 1980); el promotor de la hormona del crecimiento, que es específico para las células de la hipófisis (Behringer *et al.*, Genes Dev. 2: 453, 1988); el promotor de la insulina, que es específico para las células pancreáticas beta (Selden *et al.*, Nature 321: 545, 1986); el promotor de la proteína ácida fibrilar de la glía, que es específico para astrocitos (Brenner *et al.*, J. Neurosci. 14: 1030, 1994); el promotor de la tirosina hidroxilasa, que es específico para las neuronas catecolaminérgicas (Kim *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 15689, 1993); el promotor de la proteína precursora amiloide, que es específico para neuronas (Salbaum *et al.*, EMBO J. 7: 2807, 1988); el promotor de la dopamina β -hidroxilasa, que es específico para neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas (Hoyle *et al.*, J. Neurosci. 14: 2455, 1994); el promotor de la triptófano hidroxilasa, que es específico para serotonina/células de la glándula pineal (Boularand *et al.*, J. Biol. Chem. 270: 3757, 1995); el promotor de la colina acetiltransferasa, que es específico para las neuronas colinérgicas (Hersh *et al.*, J. Neurochem. 61: 306, 1993); el promotor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), que es específico para las células catecolaminérgicas/5-HT/tipo D (Thai *et al.*, Mol. Brain Res. 17: 227, 1993); el promotor de la proencefalina, que es específico para las células neuronales/espermatogénicas epididimales (Borsook *et al.*, Mol. Endocrinol. 6: 1502, 1992); el promotor de reg (proteína de cálculo pancreático "pancreatic stone protein"), que es específico para tumores de colon y recto, y células del páncreas y el riñón (Watanabe *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 7432, 1990); y el promotor del péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP), que es específico para tumores de hígado e intestino ciego, y células de neurilemoma, riñón, páncreas y suprarrenales (Campos *et al.*, Mol. Rnfovtinol. 6: 1642, 1992).

Ejemplos de promotores que funcionan específicamente en células tumorales incluyen el promotor de la estromelina 3, que es específico para células de cáncer de mama (Basset *et al.*, Nature 348: 699, 1990); el promotor de la proteína A tensioactiva, que es específico de células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Smith *et al.*, Hum. Gene Ther. 5: 29-35, 1994); el promotor del inhibidor de la leucoproteasa secretora (SLPI), que es específico para carcinomas que expresan SLPI (Garver *et al.*, Gene Ther. 1: 46-50, 1994); el promotor de la tirosinasa, que es específico para células de melanoma (Vile *et al.*, Gene Therapy 1: 307, 1994; documento WO 94/16557; documento WO93/GB1730); el promotor de grp78/BiP inducible por estrés, que es específico para células de fibrosarcoma/tumorigénicas (Gazit *et al.*, Cancer Res. 55(8): 1660, 1995); el potenciador de AP2 adiposo, que es específico para adipocitos (Graves, J. Cell. Biochem. 49: 219, 1992); el promotor de la α -1 antitripsina transtiretina, que es específico para hepatocitos (Grayson *et al.*, Science 239: 786, 1988); el promotor de la interleucina-10, que es específico para células multiformes de glioblastoma (Nitta *et al.*, Brain Res. 649: 122, 1994); el promotor de c-erbB-2, que es específico para células pancreáticas, de mama, gástricas, ováricas y de pulmón de células no pequeñas (Harris *et al.*, Gene Ther. 1: 170, 1994); el promotor de la proteína 27 de choque térmico/ α -B-cristalina, que es específico para células tumorales del cerebro (Aoyama *et al.*, Int. J. Cancer 55: 760, 1993); el promotor del factor de crecimiento de fibroblastos básico, que es específico para células de glioma y meningioma (Shibata *et al.*, Growth Fact. 4: 277, 1991); el promotor del receptor del factor de crecimiento epidérmico, que es específico para carcinoma de células escamosas, glioma, y células de cáncer de mama (Ishii *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:282, 1993); el promotor de la glucoproteína similar a la mucina (DF3, MUC1), que es específico para células de carcinoma de mama (Abe *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 282, 1993); el promotor de mts1, que es específico para tumores metastásicos (Tulchinsky *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9146, 1992); el promotor de NSE, que es específico para células de cáncer de pulmón de células pequeñas (Forss-Petter *et al.*, Neuron 5: 187, 1990); el promotor del receptor de la somatostatina, que es específico para células de cáncer de pulmón de células pequeñas (Bombardieri *et al.*, Eur. J. Cancer 31A: 184, 1995; Koh *et al.*, Int. J. Cancer 60: 843, 1995); los promotores de c-erbB-3 y c-erbB-2, que son específicos para células de cáncer de mama (Quin *et al.*, Histopathology 25: 247, 1994); el promotor de c-erbB-4, que es específico para células de cáncer de mama y gástrico (Rajkumar *et al.*, Breast Cancer Res. Trends 29: 3, 1994); el promotor de la tiroglobulina, que es específico para células de carcinoma tiroideo (Mariotti *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Meth. 80: 468, 1995); el promotor de la α -fetoproteína, que es específico para células de hepatoma (Zuibel *et al.*, J. Cell. Phys. 162: 36, 1995); el promotor de la villina, que es específico para células de cáncer gástrico (Osborn *et al.*, Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 413: 303, 1988); y el promotor de la albúmina, que es específico para células de hepatoma (Huber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8099, 1991).

Tal como se observó anteriormente, los constructos de cromosomas artificiales de la invención pueden utilizarse en métodos *in vivo*, por ejemplo, para introducir un producto génico terapéutico dentro de una célula, o para destruir una célula, o bien directa o bien indirectamente, a través de un intermediario viral lítico. Para llevar a cabo estos métodos, los constructos de cromosomas artificiales pueden administrarse mediante cualquier vía convencional utilizada en medicina. Como guía general, un constructo de cromosoma artificial de la invención puede administrarse directamente dentro del tejido en el que se desea un efecto, por ejemplo, la expresión, por ejemplo, mediante inyección directa o mediante métodos quirúrgicos (por ejemplo, inyección estereotáctica dentro de un tumor cerebral; Pellegrino *et al.*, Methods in Psychobiology (Academic Press, Nueva York, Nueva York, 67-90, 1971)). Un método adicional que puede utilizarse para administrar constructos de cromosomas artificiales dentro del cerebro el es método de convección descrito por Bobo *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080, 1994) y Morrison *et al.* (Am. J. Physiol. 266: 292-305, 1994). En el caso del tratamiento tumoral, como una alternativa a la inyección directa en el tumor, puede llevarse a cabo cirugía para extirpar el tumor, e inocularse los constructos de cromosomas artificiales de la invención dentro del lecho del tumor reseccionado para garantizar la destrucción de cualquier célula tumoral restante.

Alternativamente, el constructo puede administrarse mediante una vía parenteral, por ejemplo, mediante una vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intraepidérmica o intramuscular, o a través de una superficie mucosa, por ejemplo, una superficie ocular, intranasal, pulmonar, oral, intestinal, rectal, vaginal o del tracto urinario.

Un constructo de cromosoma artificial formulado en asociación con bupivacaína (véase más adelante) se administra ventajosamente dentro del tejido muscular. Cuando se utiliza un lípido catiónico o un liposoma neutro o aniónico, tal como DOTMA o DC-Chol (véase más adelante), la formulación puede inyectarse ventajosamente a través de las vías intravenosa, intranasal (aerosolización), intramuscular, intradérmica, o subcutánea. Un constructo de cromosoma artificial en una forma desnuda puede administrarse ventajosamente a través de las vías intramuscular, intradérmica o subcutánea.

En la invención puede utilizarse cualquiera de varias formulaciones bien conocidas para introducir moléculas de ácido nucleico dentro de células en mamíferos. (Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA.) Por ejemplo, los constructos de cromosomas artificiales pueden utilizarse en una forma desnuda, libres de cualquier vehículo de administración o acondicionamiento. Los constructos de cromosomas artificiales pueden diluirse simplemente en una disolución fisiológicamente aceptable, tal como solución salina estéril o solución salina estéril tamponada, con o sin un vehículo. Los constructos de cromosomas artificiales también pueden administrarse en disoluciones de fosfato de calcio.

Los constructos de cromosomas artificiales también pueden asociarse con agentes que facilitan la captación celular de las moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, los constructos de cromosomas artificiales pueden complementarse con un agente químico que modifica la permeabilidad celular, tal como bupivacaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/16737), encapsularse dentro de un liposoma, o asociarse con lípidos catiónicos o micropartículas de sílice, oro o tungsteno.

Los liposomas aniónicos y neutros son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Liposomes: A Practical Approach, RPC New Ed, IRL press (1990), para una descripción detallada de los métodos para obtener liposomas) y son útiles para administrar una gran variedad de productos, incluyendo moléculas de ácido nucleico. Los lípidos catiónicos también son bien conocidos y se utilizan comúnmente para la administración de genes. Tales lípidos incluyen Lipofectin™, también conocido como DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano), DDAB (bromuro de dimetildioctadecilamonio), DOGS (dioctadecilamidologlicil espermina) y derivados del colesterol, tales como DC-Chol (3 beta-(N-(N',N'-dimetilaminometano)-carbamoyl)colesterol). Una descripción de estos lípidos catiónicos puede encontrarse en los documentos EP 187.702, WO 90/11092, la patente de los EE.UU. número 5.283.185, los documentos WO 91/15501 y WO 95/26356, y la patente de los EE.UU. número 5.527.928. Los lípidos catiónicos para la administración de genes se utilizan preferiblemente en asociación con un lípido neutro, tal como DOPE (dioleil-fosfatidiletanolamina) tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 90/11092.

Pueden añadirse a las formulaciones que contienen liposomas catiónicos otros compuestos que facilitan la transfección. Varios de estos compuestos se describen, por ejemplo, en los documentos WO 93/18759, WO 93/19768, WO 94/25608 y WO 95/2397. Incluyen, por ejemplo, derivados de espermina útiles para facilitar el transporte de ADN a través de la membrana nuclear (véase, por ejemplo, el documento WO 93/18759) y compuestos de permeabilización de la membrana tales como GALA, gramicidina S, y sales biliares catiónicas (véase, por ejemplo, el documento WO 93/19768).

También pueden utilizarse micropartículas de oro o tungsteno para la administración de genes, tal como se describe en los documentos WO 91/359, WO 93/17706, y en Tang *et al.* (Nature 356: 152, 1992). En este caso, las moléculas de ácido nucleico recubiertas por micropartículas pueden inyectarse por vía intradérmica o intraepidérmica utilizando dispositivos de inyección sin aguja ("pistola génica"), tales como los descritos en la patente de los EE.UU. número 4.945.050, la patente de los EE.UU. número 5.015.580 y el documento WO 94/24263.

La cantidad de constructo de cromosoma artificial que debe administrarse depende, por ejemplo, del objetivo específico que debe lograrse, de la concentración de cualquier promotor utilizado en el constructo, del estado del mamífero en el que se desea la administración (por ejemplo, el peso, la edad y la salud general del mamífero), el modo de administración y el tipo de formulación. En general, se administra a seres humanos adultos una dosis terapéutica o profilácticamente eficaz de, por ejemplo, desde aproximadamente 1 ng hasta aproximadamente 1 mg, preferiblemente, desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 800 µg. La administración puede lograrse en una dosis única o repetida a intervalos.

Además de utilizarse en métodos terapéuticos, los constructos de cromosomas artificiales de la invención pueden utilizarse para producir virus recombinantes de forma económica y eficaz *in vitro*. Tal como se trató anteriormente, los métodos de producción viral anteriores han empleado juegos de cósmidos que contienen partes de genomas virales que se recombinan para generar genomas virales completos con la introducción dentro de células. Este método puede dar como resultado la inestabilidad del genoma viral. Los constructos de cromosomas artificiales de la invención desvían de la necesidad de recombinación entre múltiples cósmidos, lo que conduce a potenciar la estabilidad del genoma viral producido. Además, los constructos de cromosomas artificiales de la invención, tal como los que incluyen BAC, pueden propagarse en los sistemas del huésped, tal como en las bacterias, que no resultan adversamente afectadas por la presencia de los genes virales que son perjudiciales para las células de mamífero. Pueden utilizarse métodos convencionales para introducir mutaciones dentro de tales constructos o para introducir genes heterólogos que van a incluirse en un vector viral recombinante.

Los constructos de cromosomas artificiales de la invención también permiten el empaquetamiento eficaz de amplímeros dentro de partículas virales recombinantes (véase, por ejemplo, el documento WO 97/05263). Los amplímeros son plásmidos que contienen un gen (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas descritas anteriormente) bajo el control de secuencias reguladoras (por ejemplo, cualquiera de los promotores o potenciadores descritos anteriormente y, opcionalmente, secuencias que dirigen el tratamiento del ARNm, tales como una secuencia de poliadenilación), un origen viral de replicación y señales de empaquetamiento viral. Tal como se describe adicionalmente más adelante en referencia al VHS, cuando un amplímero se cotransfecta dentro de una célula con un constructo de cromosoma artificial de la invención, que incluye ADN viral que da como resultado la formación de un virus recombinante con la introducción dentro de una célula, el amplímero se empaqueta en un virión, proporcionando así un vector de administración de genes eficaz. Los virus recombinantes producidos utilizando estos métodos pueden utilizarse, por ejemplo, como vectores virales para tratamiento, por ejemplo, para terapia génica.

Los constructos de cromosomas artificiales de la invención también pueden utilizarse en métodos para generar líneas celulares que pueden utilizarse, por ejemplo, para la producción de virus. Como un ejemplo específico, puede obtenerse un constructo de VHS-BAC en el que se muta o se deleta uno cualquiera o cualquier combinación de genes tempranos inmediatos (es decir, ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47), utilizando métodos convencionales, tales como los descritos anteriormente. Opcionalmente, puede insertarse un gen que codifica para un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a antibióticos (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina), dentro del genoma viral en una región no esencial (véase anteriormente) o dentro de BAC. Este constructo puede transfectarse entonces dentro de células (por ejemplo, células Vero, véase anteriormente) utilizando métodos convencionales, y pueden seleccionarse clones que contienen el VHS integrado mediante el cultivo de las células en presencia de, por ejemplo, el antibiótico. Las células producidas de esta manera no producen virus, sin manipulación adicional, debido a la pérdida del(de los) gen(es) temprano(s) inmediato(s). Por tanto, las células pueden cultivarse en ausencia de la citotoxicidad que puede asociarse con la producción viral. Cuando se desea inducir la producción de virus en estas células, el(los) gen(es) temprano(s) inmediatos(s) desaparecidos pueden introducirse dentro de las células mediante transfección.

Estos métodos proporcionan ventajas significativas con respecto a los métodos anteriores, que al requerir la introducción simultánea de múltiples plásmidos grandes dentro de una única célula, son ineficaces y caros. Además, es sencillo llevar a cabo la delección o mutación de genes propagados en bacterias, al igual que es posible cuando se utilizan los constructos de cromosomas artificiales bacterianos de la invención. Por el contrario, el intento de conseguir esto utilizando líneas celulares es extremadamente difícil, si no imposible. Finalmente, aunque descritos anteriormente con referencia a VHS-BAC, estos métodos pueden adaptarse fácilmente para emplear el uso de cualquiera de los constructos de cromosomas artificiales descritos anteriormente.

35 Resultados experimentales

Generación de virus recombinantes y plásmidos BAC

Se utilizó la tecnología del cromosoma artificial bacteriano (BAC) para clonar la totalidad del genoma de VHS. Se construyó un plásmido, BAC-TK, con secuencias de tk virales que flanquean las señales necesarias para el mantenimiento cromosómico en la bacteria y el gen de resistencia a cloramfenicol (figura 1). Este plásmido se linealizó y se contranfectó con ADN infeccioso de VHS-1 dentro de células Vero (ATCC CRL 1587). Las reservas de virus resultantes se seleccionaron con aciclovir 100 μ M (ACV), y los virus resistentes se aislaron y se purificaron en placa. Los análisis de inmunotransferencia de tipo Southern blot y PCR confirmaron la inserción de BAC y las secuencias de cloramfenicol dentro del locus de *tk*. El virus recombinante se denominó VHS-BAC-TK.

Las células Vero se infectaron durante 2 horas con VHS-BAC-TK a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de 3, se recogieron y se extrajo el ADN tal como se describe más adelante en Materiales y Métodos. El ADN circular aislado se sometió a electroporación dentro de *E. coli* y las colonias recombinantes se seleccionaron según su resistencia a cloramfenicol. Las bacterias que eran resistentes al antibiótico se sometieron a análisis adicional. Brevemente, se extrajo el ADN de 11 colonias y se sometió a análisis de PCR utilizando juegos de cebadores correspondientes a los genes US6, UL10, UL30, y UL40 de VHS. Todos los clones 1 probados fueron positivos para los cuatro juegos de cebadores. Se extrajo el ADN de 8 de los 11 clones y se digirió con EcoRI, EcoRV y HindIII. Los resultados mostraron que se había clonado la totalidad del genoma de VHS.

Rescate de la progenie del virus infeccioso de los clones de VHS-BAC

Se seleccionaron dos clones de los 8 originales, p25 y p26, para el análisis adicional. La transfección de estos plásmidos BAC dio como resultado la formación de placas tras dos días. Los virus rescatados se amplificaron y el ADN viral se extrajo y se digirió con endonucleasas de restricción. Los patrones de la endonucleasa de restricción de los virus rescatados r25 y r26 fueron idénticos a los de p25, p26, y VHS-BAC-TK. Para determinar si los virus rescatados se comportaban de manera similar a los virus originales, los tres virus se sometieron a prueba en una curva de crecimiento de una etapa (figura 2). Los resultados muestran que hay poca o ninguna diferencia en las tasas de crecimiento de los virus de entrada originales y de los virus rescatados mediante bacterias a lo largo del tiempo.

Construcción y caracterización de un mutante VHS UL54

Para ilustrar el poder de la genética bacteriana en la construcción de mutantes de VHS, el gen esencial de VHS, UL54, puede delecionarse tal como sigue. (Véanse las figuras 3A y 3B.) El producto génico del gen UL54, ICP27, desempeña muchos papeles en la infección del VHS. La proteína, que es esencial para el crecimiento viral, se encuentra predominantemente en el núcleo, donde inhibe el corte y empalme (splicing) del pre-ARNm, interacciona con las partículas de ribonucleoproteína nuclear pequeñas de la célula huésped, se une al ARN, evita el transporte nucleocitoplásmico de ARNm que contiene intrones y regula la síntesis de proteínas de genes tardíos facilitando la exportación de los ARN virales tardíos.

Para clonar las secuencias flanqueantes para recombinación homóloga, pueden utilizarse dos juegos de cebadores. Un juego se une a una secuencia que se sitúa inmediatamente en el sentido de 5' de la secuencia codificante de UL54 y a una secuencia aproximadamente 1 kb en el sentido de 5' desde este sitio, es decir, en el gen UL53. El segundo juego se une a las secuencias inmediatamente en 3' del codón de terminación de UL54 y a una secuencia aproximadamente 1 kb en el sentido de 3' desde este sitio, es decir, en el gen UL55. Los fragmentos de PCR generados utilizando estos cebadores pueden clonarse dentro de placi, generando p53-laci-55. Las secuencias que codifican para kanamicina pueden amplificarse mediante PCR y clonarse en el marco con las secuencias de lacZ de α -complementación de p53-placi-55 para crear p53-laci-kan-UL55. La recombinación homóloga entre este plásmido y el ADN de BAC da como resultado la sustitución de las secuencias que codifican para UL54 de VHS dirigiendo el promotor laci las secuencias de fusión a lacZ de α -complementación/kanamicina. Las secuencias de p53-placi-kan-55 pueden liberarse de la estructura del plásmido, purificarse en gel y transformarse dentro de *E. coli* competente que contiene p25. Los recombinantes pueden seleccionarse entonces para determinar su capacidad para crecer en placas de kanamicina, IPTG y cloramfenicol. Puede utilizarse la hibridación de Southern para confirmar la presencia de la mutación.

Pudo analizarse adicionalmente un clon que tenía la mutación correcta, que pudo designarse como p Δ UL54, tal como sigue. La cinética de crecimiento de r Δ UL54, el virus rescatado de p Δ UL54, r25, VHS-BAC-TK, y la cepa F del VHS de tipo natural, pudo compararse en células 2-2 y Vero. Las células 2-2 son una línea celular estable que expresa constitutivamente ICP27 y, por tanto, pueden complementar el defecto de UL54. Se esperaría que los cuatro virus se replicaran hasta los niveles del tipo natural en las células 2-2, pero no se esperaría que r Δ UL54 creciera en las células Vero. Pudieron llevarse a cabo patrones de endonucleasa de restricción del ADN extraído de los virus mutantes rescatados o del ADN del plásmido de entrada para confirmar que los plásmidos BAC permanecían estables durante el procedimiento de mutagénesis.

Amplímeros de empaquetamientos de ADN de VHS-BAC

Los vectores basados en el VHS se han utilizado ampliamente para la transferencia génica. Los vectores de plásmidos de VHS (amplímeros) contienen un casete de expresión eucariótico y las señales de VHS para la replicación y el empaquetamiento. El vector de amplímero se replica y se empaqueta dentro de viriones cuando se propaga conjuntamente con un virus cooperador (helper), ya sea el virus de tipo natural, el virus con deficiencia en la replicación o el virus generado a partir de cósmidos de VHS. De hecho, se ha utilizado un juego de cósmidos modificado para producir preparaciones de amplímeros que están libres de virus cooperador contaminante (Fraefel *et al.*, citado anteriormente). Sin embargo, los cósmidos de los virus herpes son propensos a la delección y a la reestructuración y, además, a menudo son de naturaleza heterogénea. Un clon BAC de VHS solventa estos problemas.

Para evaluar la estabilidad de los clones VHS-BAC, en comparación con los clones de cósmido de VHS, se purificaron y se digirieron ADN aislados de cultivos bacterianos crecidos continuamente durante 1, 3 ó 7 días. (Véase la figura 4 para los resultados obtenidos en las muestras tomadas en los días 1 y 7.) El patrón de la endonucleasa de restricción de p25 permaneció sin cambios durante todo este periodo, mientras que el patrón de la endonucleasa de restricción del cósmido 14 (Cunningham *et al.*, citado anteriormente) se alteró drásticamente. La heterogeneidad en la población bacteriana se evaluó realizando cultivos en línea de *E. coli* que contenían o bien p25 o bien el cósmido 48 (Cunningham *et al.*, citado anteriormente) y obteniendo minipreparaciones de 5 clones cada una. Los resultados mostraron que *E. coli* que contenía clones BAC era homogénea, mientras que *E. coli* que contenía clones de cósmido era heterogénea en naturaleza. Por tanto, el mantenimiento de las secuencias de VHS en BAC es preferible para la producción de ADN viral infeccioso y homogéneo para fines terapéuticos.

Se sometieron a prueba las funciones *trans* mediante la determinación de la capacidad del ADN de VHS-BAC para empaquetar el ADN plasmídico de amplímero. Se propagó conjuntamente un plásmido de amplímero que contenía el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor IE 4/5, o un plásmido de amplímero que contenía un gen lacZ bajo el control del promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR) (pHSVlac), o bien con p25 transfectado, ADN de cósmido de VHS (6, 28, 14, 56 y 48; Cunningham *et al.*, citado anteriormente), o ADN viral de cepa F infeccioso (ATCC VR-733). Se recogieron las células tras cuatro días y se titularon las partículas infecciosas mediante la infección de nuevas monocapas y contando o bien las placas, o bien las células verdes, o bien las células azules (tabla 2). Los resultados demostraron que el ADN de VHS-BAC podría empaquetar amplímeros de manera más eficaz que el ADN de cósmido y el ADN viral infeccioso. Estos datos demostraron que VHS-BAC, con las modificaciones apropiadas, puede usarse como un potente vector para la transferencia génica.

Materiales y métodos

Virus y células

- 5 Se propagaron y se sometieron a ensayo células Vero y Vero 2-2 para determinar la sensibilidad a fármacos tal como se describió por Coen *et al.* (Virology 168: 221-231, 1989). Se determinaron los títulos de virus por triplicado en células Vero. Los virus recombinantes se purificaron en placa dos veces y se confirmaron las mutaciones mediante hibridación por inmunotransferencia de tipo Southern y análisis de PCR.

10 Plásmidos

- Se creó un plásmido pTK-AB mediante subclonación del fragmento BglII/EcoRI a partir de pXhoIf (el fragmento XhoI F de la cepa 17 de VHS-1 clonado dentro del plásmido pAT153) dentro de los sitios BamHI/EcoRI de pVHSLac (Geller *et al.*, citado anteriormente). El plásmido que contiene *tk*, BH13 (Horsburgh *et al.*, Cell 86(6): 949-959, 1996) se digirió con PstI y XhoI, para liberar el extremo 3' del gen *tk*, y el fragmento se sometió a subclonación dentro del sitio PstI/XhoI de pSC1180, creando el plásmido TK-CD. Los plásmidos TK-AB y TK-CD se sometieron a digestión con HindIII/MscI y HindIII/SalI, respectivamente, y los fragmentos resultantes se sometieron a subclonación dentro de los sitios HpaI/SalI de pBeloBAC (Dr. H. Shizuya y Dr. M. Simon, Departamento de Biología, Instituto de Tecnología de California, Pasadena, CA) para crear el plásmido pBAC-TK (figura 1).

- 20 Se generó pLaci mediante digestión de pBluescript KS (Stratagene) con SacI y NaeI, creación de extremos romos con ADN polimerasa de T4, y religamiento. Se amplificaron las secuencias de UL53, UL53 y kanamicina mediante PCR usando cebadores que contenían sitios PvuII, HindIII, y KpnI/XhoI, respectivamente (tabla 1). El fragmento UL53 se digirió con PvuII y se clonó dentro del único sitio PvuII de pLaci, creando UL53-pLaci. La orientación del fragmento se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción. Asimismo, se digirió el fragmento UL55 con HindIII y se clonó dentro del sitio HindIII de UL53-pLaci, creando UL53-pLaci-UL55. La orientación se confirmó mediante digestión de restricción. El fragmento de kanamicina se digirió con KpnI y XhoI, y se clonó dentro de UL53-pLaci-UL54 digerido con KpnI/XhoI. Esto da como resultado una fusión dentro del marco de lectura ("in-frame fusion") de la α -complementación de lacZ y las secuencias de kanamicina. Este plásmido se denominó UL53-pLaci-kan-UL55. Se construyó pVHS-GFP (proteína fluorescente verde - Green Fluorescent Protein) mediante la sustitución de secuencias lacZ en pVHSLac (Geller, citado anteriormente) con secuencias de GFP.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- 35 Se obtuvieron fragmentos amplificados por PCR usando ADN genómico viral o ADN de plásmido y los oligonucleótidos que figuran en la tabla 1 como cebadores. Se usó la Taq ADN polimerasa (Promega) para amplificar la región de interés, según las recomendaciones de Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y se llevaron a cabo 30 ciclos (95°C, 1 minuto, 55°C, 1 minuto, 72°C, 1 minuto) en un Perkin Elmer GeneAmp 2400.

40 Construcción de virus

- Se digirió un plásmido BAC-TK con HindIII y se cotransfectó dentro de células Vero con ADN de cepa F de VHS-1 infeccioso, tal como se describió por Chiou *et al.* (Virology 145(2): 213-226, 1985). Se sometió a selección el ADN de las placas que fueron resistentes a aciclovir (ACV) 100 μ M mediante PCR usando cebadores que se corresponden con las secuencias de cloramfenicol (tabla 1). A partir de dos transfecciones independientes, un virus recombinante se purificó en placa dos veces y se confirmó la mutación mediante hibridación por inmunotransferencia de tipo Southern. Este virus se denominó VHS-BAC.

50 Aislamiento de ADN de VHS-BAC y plásmidos BAC

- Se infectaron placas de cien mm de células Vero confluentes con VHS-BAC a una m.o.i. de 3. Se permitió que las infecciones avanzaran durante dos horas, se eliminaron los sobrenadantes y se añadió 1 ml de DNazole (Gibco). El ADN, obtenido a partir del lisado celular siguiendo el protocolo del fabricante, se resuspendió en 100 μ l de TE. Se añadió un μ l de ADN a un volumen igual de agua y se sometió a electroporación en 25 μ l de *E. coli* electro-competente, cepa DH10B (Hanahan *et al.*, Métodos Enzymol. 204: 63-113, 1991), usando un porador de células ("cell-porator") (Gibco) y las condiciones recomendadas por el fabricante. Se permitió que las bacterias se recuperaran mediante incubación a 37°C en caldo LB, se sembraron sobre placas de agar LB que contenían cloramfenicol (12,5 ng/ml), y se incubaron a 37°C durante la noche. Se aislaron plásmidos BAC a partir de *E. coli* usando un procedimiento de lisis alcalina y se seleccionaron mediante PCR. Se usaron cuatro juegos de cebadores para amplificar secuencias en US6, UL10, UL30 y UL40 (tabla 1). Se transfectaron 2 μ g de ADN de clones que fueron positivos a todos los juegos de cebadores dentro de placas de 100 mm de células Vero usando 18 μ l de lipofectamina, y se incubaron a 34°C. Se observaron placas virales a los dos días tras la transfección.

65 Mutagénesis de BAC

- Se hicieron competentes bacterias que contenían p25 mediante un tratamiento con CaCl₂. Se digirió pUL53-pLaci-kan-UL55 con XbaI, MluI, y ScaI, y las secuencias UL53-pLaci-kan-UL55 se purificaron en gel y se sometieron a

ES 2 270 580 T3

transformación dentro de *E. coli* p25. Se permitió que las bacterias se recuperaran durante 2 horas a 37°C en presencia de IPTG 1 mM, después se sembraron en placas con kanamicina/IPTG (5 mg/ml y 1 mM, respectivamente). Se confirmaron las mutaciones mediante PCR e hibridación por inmunotransferencia de tipo Southern. Se sometieron a prueba los virus mutantes para determinar el crecimiento en células 2-2 y Vero.

Producción de amplímero

Se transfectaron células 2-2 con 1, 2 ó 4 µg de o bien p25, o bien juego de cósmidos de VHS 6, 28, 14, 56 y 48 (Cunningham *et al.*, citado anteriormente), o bien ADN de cepa F de VHS infeccioso y 1 g de pVHS-GFP, tal como se describió por Fraefel *et al.* (J. Virol. 70(10): 7190-7197, 1996). Tras cuatro días se recogieron las células, se congelaron y descongelaron tres veces, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación, y el sobrenadante se usó para infectar monocapas nuevas. Se calcularon los títulos contando placas virales y células verdes transducidas.

TABLA 1

Cebadores

Cloramfenicol	5'-AGGCCGGATAGCTTGTGC-3' (SEQ ID NO:1)
	5'-CGGAACAGAGAGCGTCACA-3' (SEQ ID NO:2)
Kanamicina	5'-GGATGAGGATCGGTACCCATGATTGAAC-3' (SEQ ID NO:3)
	5'-ATACTCATACTCGAGCTCTTCCTTTTTC-3' (SEQ ID NO:4)
US6	5'-CCGAATGCTCCTACAACAAG-3' (SEQ ID NO:5)
	5'-GTCTTCCGGGGCGAGTTCTG-3' (SEQ ID NO:6)
UL10	5'-GGTGTAGCCGTGCCCCCTCAG-3' (SEQ ID NO:7)
	5'-GCAGATACGTCCCGCTCAGG-3' (SEQ ID NO:8)
UL30	5'-ATCAACTTCGACTGGCCCTTC-3' (SEQ ID NO:9)
	5'-CCGTACATGTGCGATGTTTACC-3' (SEQ ID NO:10)
UL40	5'-ACCGCTTCCTGTTGCTTTTC-3' (SEQ ID NO:11)
	5'-CCCGCAGAAGGTTGTTGGTG-3' (SEQ ID NO:12)
UL53	5'-CCTCTCGGGCACAGCTGTGCGATTGTG-3' (SEQ ID NO:13)
	5'-AAGCGTGACCGCAGCTGGAACACGGCTG-3' (SEQ ID NO:14)
UL55	5'-CGTGTCTGCAAGCTTACGGCCAGTC-3' (SEQ ID NO:15)
	5'-CCATGCCGCTGAAGCTTATGGAGCGCAGG-3' (SEQ ID NO:16)

TABLA 2

VHS-ADN + pAmplímero		VHS-ADN + pUC	
	u.t./ml	u.f.p./ml	u.f.p./ml
p25	3×10^6	9×10^5	1×10^7
ADNi	$1,5 \times 10^5$	n/r	n/r
cósmidos Δa	2×10^5	n/a	n/a
cósmidos wt	$3,5 \times 10^5$	n/r	n/r

Los ensayos, tal como se han descrito en materiales y métodos, se repitieron entre 3 y 16 veces para obtener valores promediados, n/a, no aplicable; n/r, no realizado; u.t., unidades de transducción; u.f.p., unidades formadoras de placa. p25 BAC ADN, véase el texto para obtener más detalles; ADNi, ADN de VHS de cepa F infeccioso; cósmidos Δa , serie de cósmidos de cepa 17 de VHS que carecen de sitios "a" tal como se describe en Fraefel et al (citado anteriormente); cósmidos wt, serie de cósmidos de cepa 17 de VHS tal como se describió en Cunningham et al. (citado anteriormente).

REIVINDICACIONES

1. Constructo de cromosoma artificial que comprende secuencias de virus herpes simplex que dirigen la formación de un virus herpes simplex recombinante con la introducción dentro de una célula.
2. Constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 1, en el que el virus recombinante es un virus lítico o un virus no lítico.
3. Constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 1, en el que el cromosoma artificial o la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico heteróloga, que preferiblemente codifica para un producto génico terapéutico, que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en factores de crecimiento, hormonas, enzimas, antígenos de vacuna, citotoxinas, proteínas inmunomoduladoras, moléculas de ARN antisentido, y ribozimas.
4. Constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 1, en el que el cromosoma artificial se selecciona del grupo que consiste en cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales derivados de P1, cromosomas artificiales de levadura, y cromosomas artificiales de mamíferos.
5. Constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 1, en el que el virus recombinante es un virus herpes simplex 1.
6. Método de producción *in vitro* de un virus recombinante en una célula, comprendiendo el método introducir el constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 1 dentro de la célula.
7. Método según la reivindicación 6, que comprende adicionalmente introducir dentro de la célula un amplímero que se empaqueta dentro de un virión de herpes simplex recombinante con la introducción del constructo de cromosoma artificial dentro de la célula, en el que dicho amplímero comprende un casete de expresión eucariótica y señales de herpes simplex para la replicación y el empaquetamiento.
8. Método de introducción *in vitro* de una secuencia de ácido nucleico heteróloga dentro de una célula, comprendiendo el método introducir el constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 3 dentro de la célula.
9. Método para destruir *in vitro* una célula, comprendiendo el método introducir dentro de la célula el constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 2, en el que el virus recombinante es un virus lítico y preferiblemente la célula es una célula cancerígena.
10. Célula que comprende un constructo de cromosoma artificial según la reivindicación 1 integrado de manera estable dentro de su genoma.
11. Célula según la reivindicación 10, en el que dicho constructo de cromosoma artificial comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un genoma de virus herpes simplex en el que un gen temprano inmediato comprende una mutación.
12. Uso del constructo de cromosoma artificial según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de un medicamento para producir un virus recombinante en una célula, introducir una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula, o destruir una célula.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que el virus recombinante es un virus lítico y preferiblemente la célula es una célula cancerígena.

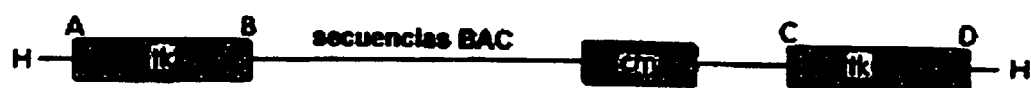


Fig. 1

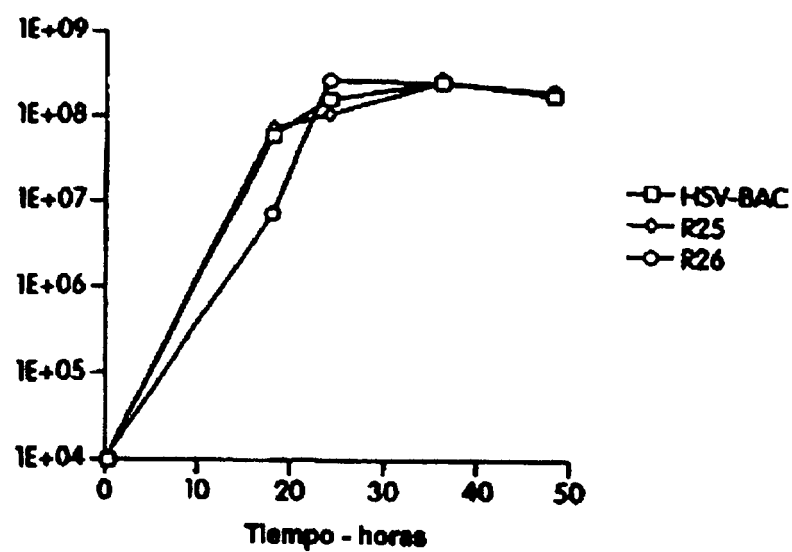
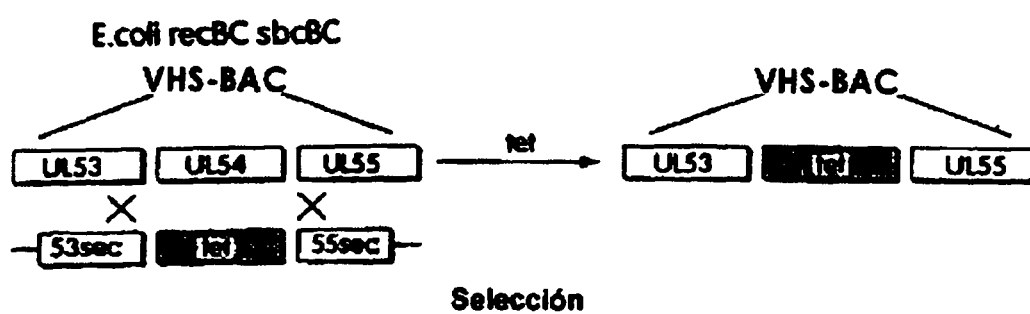


Fig. 2

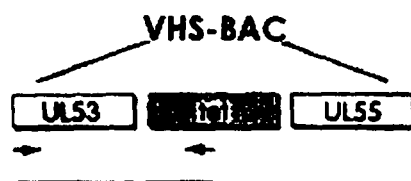
Mutagénesis de VHS-BAC



Selección

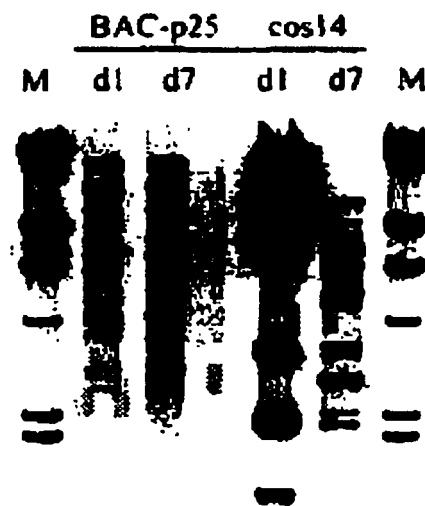
Fig. 3A

Mutagénesis de VHS-BAC



PCR

Fig. 3B



Estabilidad de plásmido BAC.p25 frente a cósmido 14. Digestión con EcoRV

Fig. 4

ES 2 270 580 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> NeuroVir, Inc.	
5	<120> CONSTRUCTOS DE CROMOSOMA ARTIFICIALES QUE CONTIENEN SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EXTRAÑAS	
	<130> 08582/007WO1	
10	<150> 09/031,006	
	<151> 1998-02-26	
15	<160> 16	
	<170> FastSEQ para Windows versión 3.0	
20	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
25	<400> 1	
	aggccggata gcttgtgc	18
30	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Escherichia coli</i>	
	<400> 2	
40	cggaacagag agcgtcac	19
	<210> 3	
	<211> 28	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
50	<400> 3	
	ggatgaggat cggtagccat gattgaac	28
55	<210> 4	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
60	<400> 4	
	atactatac tcgagctctt cctttttc	28
65	<210> 5	
	<211> 20	

ES 2 270 580 T3

	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
5	<400> 5	
	ccgaatgctc ctacaacaag	20
10	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
15	<400> 6	
	gtcttccggg gcgagttctg	20
20	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Virus herpes simplex	
	<400> 7	
30	ggtgtagccg tgcccctcag	20
	<210> 8	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
	<400> 8	
40	gcagatacgt cccgctcagg	20
	<210> 9	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
50	<400> 9	
	atcaacttcg actggccctt c	21
55	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
60	<400> 10	
	ccgtacatgt cgatgttcac c	21
65	<210> 11	
	<211> 20	

ES 2 270 580 T3

	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
5	<400> 11	
	accgcttct cttcgcttc	20
10	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
15	<400> 12	
	cccgcaagaag gttgttggtg	20
20	<210> 13	
	<211> 27	
	<212> ADN	
25	<213> Virus herpes simplex	
	<400> 13	
30	cctctcgggc acagctgtgc gattgtg	27
	<210> 14	
	<211> 28	
35	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
	<400> 14	
40	aagcgtgacc gcagctggaa cacggctg	28
	<210> 15	
45	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Virus herpes simplex	
50	<400> 15	
	cgtgtctgca agcttacggc cagtc	25
55	<210> 16	
	<211> 29	
	<212> ADN	
60	<213> Virus herpes simplex	
	<400> 16	
65	ccatgccgct gaagcttatg gagcgagg	29