



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 188**

51 Int. Cl.:
C12N 15/64 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02790914 .2**
96 Fecha de presentación : **26.12.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1469077**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

54 Título: **Vector de expresión/replicación específico para células.**

30 Prioridad: **28.12.2001 JP 2001-402102**
30.08.2002 JP 2002-255395

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73 Titular/es:
JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY
1-8, Honcho 4-chome
Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012, JP

72 Inventor/es: **Takahashi, Katsuhito y**
Yamamura, Hisako

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 358 188 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).

DESCRIPCION**CAMPO TÉCNICO**

La presente descripción se refiere a un vector de expresión/replicación específico de células que puede expresar específicamente un gen en una célula específica, y que no actúa sobre las células adultas normales que se autorreplican; un vector celular de expresión/replicación específico para células que puede suprimir la expresión /replicación en un período deseado, después de su expresión/replicación; un procedimiento para expresar un gen en una célula específica en un organismo vivo utilizando el vector, o un procedimiento para alterar una célula específica utilizando el vector, etc. Para una descripción con mayor detalle, se hace referencia a: (1) la construcción, en el ámbito de la terapia génica para el cáncer, de un vector de expresión/replicación específico para células de alta seguridad, en la que un vector de expresión/replicación que puede expresar genes específicamente celulares para alterar específicamente una célula cancerosa particular, o una célula muscular lisa proliferante que se genera en el nuevo vaso sanguíneo tumoral, permita el tratamiento sin dañar las células normales y pueda eliminar completamente las células infectadas por el vector después de que la terapia haya finalizado, (2) la construcción de un vector de expresión/replicación específico para células de alta seguridad en el ámbito de la terapia génica contra la fibrosis, tal como la fibrosis pulmonar y la fibrosis hepática, en la que un vector de expresión/replicación que pueda expresar específicamente genes celulares para alterar de modo específico los miofibroblastos proliferantes que se generan, permita el tratamiento sin dañar las células normales y pueda eliminar completamente las células infectadas por el vector después de que la terapia haya concluido, (3) la construcción de un vector de expresión/replicación específico para células de alta seguridad, en el ámbito de la terapia génica, para afecciones tales como la vasoconstricción, arterioesclerosis, restenosis, retinopatía diabética y similares, después del emplazamiento de endoprótesis vasculares o del trasplante de órganos, en la que se genera un vector de expresión/replicación que puede expresar genes específicamente celulares para alterar de modo específico las células musculares lisas proliferantes, que permita el tratamiento sin afectar a las células normales y que pueda eliminar completamente las células infectadas por el vector, después de que la terapia haya finalizado, (4) la construcción de un vector de expresión/replicación específico para células de alta seguridad en el ámbito de la terapia génica para la glomerulonefritis, en la que se genera un vector de expresión/replicación que puede expresar genes específicamente celulares para alterar de modo específico las células mesangiales proliferantes, que permita el tratamiento sin afectar a las células normales y pueda eliminar completamente las células infectadas por el vector, después de que la terapia haya finalizado.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Recientemente, se deseado un procedimiento terapéutico ideal para el cáncer, con menos efectos secundarios, en el que las células normales no resulten afectadas y las cancerosas sólo puedan dañarse selectivamente. La terapia génica resulta ejemplificativa, pudiendo ésta aumentar la selectividad de las células cancerosas a varios niveles, tales como la actividad promotora de la expresión y de la selectividad celular de un gen que se introduzca en la célula cancerosa, o el procedimiento de inducción e infección por un vector viral, acaparando la atención como una prometedora terapia en el futuro. Sin embargo, existe un problema habitual, y es que el gen terapéutico no puede introducirse en todas las células cancerosas. Contrariamente a esto, en la inmunoterapia para el cáncer, ya que la expresión de un antígeno de diferenciación específico-tisular se observa ligeramente también en las células normales, han constituido un problema los efectos secundarios con respecto a las células normales. Además, ya que los antígenos cancerosos que se basan en una mutación presentan la característica de que ésta se limita a los cánceres individuales, no resulta apropiado generalizar con una inmunoterapia para el cáncer que esté dirigida molecularmente.

Recientemente, se ha llevado a cabo en los Estados Unidos y en Inglaterra un estudio clínico de terapia génica, con respecto a un tumor cerebral maligno, utilizando un virus del herpes simple competente para la replicación (HSV, vector) que, daña selectiva y continuamente sólo sobre las células proliferantes mediante la infección y la replicación (Gene Ther. 7, 859-866, 2000; Gene Ther. 7, 867-874, 2000). El vector HSV que se replica es un vector en el que la ribonucleótido reductasa (RR) o la timidina cinasa (TK), que son esenciales para la replicación vírica, están suprimidas. Estas enzimas se expresan en las células normales sólo cuando proliferan, pero se expresan constitutivamente en las células tumorales. Por tanto, cuando este vector HSV infecta a una célula que experimenta una proliferación intensa, sin considerar si es una célula normal o una célula tumoral, experimenta replicación con las RR o TK derivadas de las células, y muestra una actividad citolítica. Mientras, en el Japón, en un experimento con animales, se informó de un efecto antitumoral de los vectores HSV que experimentan replicación, contra el cáncer prostático y el cáncer pancreático (J. Surg. Oncol. 72, 136-141, 1999). Sin embargo, éstos no presentan selectividad celular, siendo baja su seguridad. Por tanto, podría utilizarse en terapia humana en un cerebro en el que el vector no se difundiera a la sangre circulante, debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, constituyendo un problema, sin embargo, que no fueran apropiados para el tratamiento en los órganos fuera del cerebro.

Tal como se ha expuesto anteriormente, se considera que será posible una nueva terapia más efectiva y segura, si puede controlarse la actividad "manipuladora" del vector HSV dirigiéndola específicamente a la célula diana. Martuza *et al.*, de los Estados Unidos, informaron de un vector HSV competente en replicación, que es selectivo para tumores hepáticos, utilizando un promotor de albúmina (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997). Sin embargo, cuando dicho vector se utiliza en el cáncer celular hepático, la expresión del gen de la albúmina disminuye, afectándose también las células hepáticas regenerativas normales y, por tanto, no se considera apropiado para la aplicación clínica en el hombre.

Sin embargo, la descripción de la patente US nº 5.728.379 ("Tumor- or cell-specific herpes simplex cirus replication") considera la posibilidad de aplicación al mesotelioma. Sin embargo, no se considera la posibilidad de su aplicación a terapias para el sarcoma humano en general, tales como el liomiosarcoma, osteosarcoma, tumor estromático gastrointestinal (GIST), vaso tumoral, lesión vascular proliferante, glomerulonefritis proliferante, fibrosis pulmonar, hepática y similares, o miofibroblasto que prolifera en el estroma de los tumores malignos.

A partir de los análisis genéticos con respecto a la causa de la enfermedad y patología del sarcoma, se informa de la existencia de genes de fusión y de la mutación de p53 y Rb en algunos tumores, pero, sin embargo, no se ha alcanzado un nivel que pueda aplicarse ampliamente a las terapias. En un experimento animal que utiliza ratones desnudos, Milas *et al.*, utilizó un vector adenovirico sin capacidad replicadora para introducir el gen p53 en las células de liomiosarcoma, e informó que existía un efecto de retraso en la proliferación de los tumores (Cancer Gene Ther. 7, 422-429, 2000). Existe también un informe con respecto a un procedimiento para introducir y expresar en el osteosarcoma, un gen suicida, la timidina cinasa, utilizando un promotor del gen de la osteocalcina (Cancer Gene Ther. 5, 274-280, 1998). Si embargo, utiliza un vector viral en el que se ha suprimido su utilidad replicadora, siendo escasa la eficiencia para la transferencia génica, y no pudiéndose, por tanto, aplicar a otro sarcoma distinto al osteosarcoma. Particularmente, según el informe de Milas *et al.*, se proporciona un ejemplo que utiliza SK-LMS-1, una progenie celular humana de músculo liso, que es la misma progenie celular que la descrita en el informe (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001). Sin embargo, se utiliza una cantidad con 100 a 1.000 veces más partículas virales en comparación con la cantidad de partículas del vector viral utilizada en el informe mencionado anteriormente, siendo la eficiencia menor que la dada a conocer en el mismo. Por tanto, a partir de los resultados de Milas *et al.* no resulta preferido, desde el punto de vista de la supresión de los efectos secundarios, minimizar el número de partículas virales que van a inyectarse en el organismo.

Además, como terapia para suprimir la angiogénesis del cáncer, se ha informado de un importante efecto antitumoral de los péptidos antiangiogénesis tales como la angiostatina y la endostatina mediante un sistema experimental con ratones, llevado a cabo por el grupo de Folkman en los Estados Unidos (Cell, 79, 315-328, 1994; Cell 88, 277-285, 1997). En el Japón, Nakamura *et al.*, han informado también de la acción supresora angiogénica de NK4, un fragmento intramolecular de un factor de crecimiento hepatocítico (HGF) (Biochem. Biophys. Res. Commun, 279, 846-852, 2000). Sin embargo, estos procedimientos presentan problemas, tales como el requerimiento de una gran cantidad de péptidos, el hecho de que exista un informe respecto a que su reproducibilidad para la endostatina es problemático, el hecho de que el mecanismo es desconocido, y además que la eficiencia en el hombre no se ha confirmado. El inhibidor de la angiogénesis, que es habitual en los ensayos clínicos, no posee selectividad celular y su eficiencia inhibidora es escasa. El péptido que inhibe la acción de la integrina en la superficie de las células endoteliales, del que informó Cheresch *et al.*, de los Estados Unidos, tampoco posee selectividad celular, y su eficiencia inhibidora es baja (J. Clin. Invest. 103, 1227-1230, 1999). Estas investigaciones se refieren en su totalidad a terapias que tienen como diana las células endoteliales vasculares, pero, sin, embargo, no se conocen agentes terapéuticos selectivos celulares enfocados en vasos tumorales compuestos de células musculares lisas vasculares proliferantes. De hecho, se ha informado de que el antagonista de un receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, que facilita la proliferación y migración de las células musculares lisas, posee una intensa acción supresora de la angiogénesis tumoral (Cancer Res. 60, 4152-4160, 2000), especulándose con la importancia de atacar el músculo liso vascular para suprimir la angiogénesis tumoral. Sin embargo, este procedimiento no es selectivo celular, y también se esperan efectos secundarios.

Además, para la lesión vascular proliferativa, en particular, la vasoconstricción después del emplazamiento de la endoprótesis vascular y del trasplante cardíaco, se han realizado tentativas con diversos agentes que suprimen la proliferación de los músculos lisos de la neointima. Sin embargo, ninguno de éstos ha conseguido prevenir la constricción. Como una reciente tentativa en terapia génica, existe un informe de Leiden *et al.*, en el que se utiliza un vector adenovirico que carece de la capacidad replicadora, para introducir selectivamente un gen LacZ en células musculares lisas de la arteria carótida de una rata después de haberla dañado con un globo, bajo el control de un promotor de SM22a, un gen homólogo de la calponina (J. Clin. Invest. 100, 1006-1014, 1997). Sin embargo, en este experimento, no fue el músculo liso proliferante de la íntima, que constituye una célula diana, sino el músculo liso de la túnica media en el que se introdujo el gen LacZ, siendo muy escasa la eficiencia de la introducción. Ulteriormente, Nabel *et al.*, llevaron asimismo a cabo un experimento utilizando un vector adenovirico sin capacidad replicadora, en el que un gen LacZ y un gen CAT (cloramfenicol acetiltransferasa) se introdujeron en la arteria de la cola bajo el control del promotor SM22a, pero sin embargo, sólo el 2,2% de las células musculares lisas de la íntima, y el 0,56% de las células musculares lisas de la túnica media, mostraron expresión génica (Mol. Med. 6, 983-991, 2000). Al contrario, según el informe de Miyatake *et al.*, en el que un vector HSV replicativo se utilizó para infectar la arteria carótida de la rata, después de dañarla con un globo (Stroke 30, 2431-2439, 1999), se observó la replicación del virus, principalmente en los músculos lisos proliferantes de la íntima, especulándose con la eficacia de utilizar un vector viral replicativo. Sin embargo, este virus no es selectivo celular, y se predicen efectos secundarios como la ruptura celular de las células de la íntima y de los fibroblastos de la adventicia. Se han presentado también otros procedimientos, tales como la introducción directa de oligonucleótidos actuando de señuelos y ADN antisentido en el vaso, pero sin embargo, la eficiencia de la introducción es baja y no puede esperarse un efecto supresor suficiente de la proliferación de músculo liso del vaso.

Además, como un intento de la reciente terapia génica con respecto a las células mesangiales proliferantes en la glomerulonefritis, se ha informado de un procedimiento en el que la decorina y el receptor TGFβ, que poseen acción

5 inhibidora de TGF β 1, y el gen quimérico de la región IgG Fc, o el señuelo de NFkappaB se introducen en el glomérulo renal, utilizando un vector liposómico (Nature Med. 2, 418-423, 1996; Kidney Int. 55, 465-475, 1999; Gene Ther. 7, 1326-1332, 2000). Sin embargo, este procedimiento no es celularmente selectivo y también se predicen efectos secundarios. Además, se ha presentado un procedimiento en el que un vector adenovírico defectuoso en la capacidad replicadora, se une a una microesfera de poliestireno y se administra a una aorta de rata, para introducir selectivamente un gen en un glomérulo renal (Kidney Int. 58, 1500-1510, 2000). Sin embargo, aparte de las células mesangiales, que causan la glomerulonefritis proliferante, la expresión de los genes introducidos se observa también en las células endoteliales vasculares, y la diana terapéutica permanece incompleta. Además, la inmunogenicidad de los adenovirus es intensa, indicándose por ello el alto riesgo que existe de evocar la respuesta inmune que conduce a la glomerulonefritis (Kidney Int. 61, S85-S88, 1997).

10 Mientras, se ha descubierto que un gen de la calponina, que se cree es un marcador de diferenciación de los músculos lisos, se expresa en las células tumorales del sarcoma derivado del hombre, e informaron de este hecho la primera vez (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1988; Sarcoma 3, 107-113, 1999; Intern. J. Cancer 82, 678-686, 1999). Por tanto, han existido informes domésticos y foráneos continuos de que los genes de la calponina se expresan anormalmente en casi 20 tipos de tumores malignos humanos derivados de las células mesenquimáticas tales como el sarcoma óseo y el sarcoma de los tejidos blandos, así como del tumor estromático gastrointestinal (GIST) y del sarcoma de las glándulas salivales, del fibrosarcoma y del neurinoma maligno. Por el análisis mediante los rayos X de la estructura cristalográfica y de los análisis funcionales *in vitro* e *in vivo* se reveló que la calponina mencionada anteriormente (h1 o básica), se une a la región C-terminal de las moléculas de actina y suprime la motilidad de deslizamiento de la actina y de la miosina (Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 150-157, 2000; J. Physiol. 529, 811-824, 2000). En un organismo adulto, el gen de la calponina se expresa selectivamente en las células musculares lisas, y se considera como un marcador de diferenciación de los vasos y del tracto gastrointestinal (Physiol. Rev. 75, 487-517, 1995).

15 Además, en la descripción de la patente US n° 5.728.379 mencionada anteriormente y en el informe proporcionado (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001), se hace referencia a un vector de replicación defectuoso en un ADN que codifica una timidina cinasa del HSV. Sin embargo, el HSV defectuoso en timidina cinasa no es sensible al aciclovir o al genciclovir, que constituyen agentes antiviral del herpes, y cuando estos vectores se aplican en terapias humanas, deberían entrañar una grave preocupación con respecto a la seguridad, si tuviera lugar la expansión de una infección inesperada del virus.

20 Además, es conocido que un HSV-1, G207, competente en la replicación, en el que las dos copias del gen gamma 34.5 que están implicadas en la replicación en las células neuronales, son defectuosas, y el que el gen LacZ se inserta en el locus-(ICP6) de la ribonucleótido reductasa (Nature Med. 1, 938-943, 1995), y en el que un vector HSV1yCD HSV-1 competente en la replicación, en el que una proteína autofluorescente y una citosina desaminasa que se expresan mediante un promotor/potenciador CMV, se insertan en el locus ICP6 mediante recombinación homóloga (Cancer Res. 61, 5447-5452, 2001), pero sin embargo, ya que ambas son defectuosas en la ribonucleótido reductasa, es posible la replicación con las células proliferantes solas, pero no existe selectividad celular. Además, no existen informes de un procedimiento de tratamiento, en el que los miofibroblastos proliferantes en las fibrosis tales como la pulmonar y la hepática, puedan ser focalizados y selectivamente alterados. Además, no han existido informes con respecto a un procedimiento de tratamiento dirigido, en el que los miofibroblastos proliferantes de los tumores malignos constituyan la diana.

25 El objetivo de la presente descripción consiste en construir un vector de expresión/replicación específico para células, para su utilización en la terapia para los tumores malignos y similares, donde los genes se expresen específicamente en una célula específica tal como en el tumor maligno o similar, y entonces replicarse, no dañando a las células normales, que pueda suprimir especialmente la expresión y replicación en un período deseado después de la expresión y replicación. Además, el objetivo de la presente descripción consiste en proporcionar un procedimiento de tratamiento, en el que dicho vector se introduzca en las células de los organismos específicos, tales como en de los tumores malignos y similares, y entonces, expresarse.

30 Se ha realizado un estudio exhaustivo para alcanzar el objetivo mencionado anteriormente, y se ha construido un vector de expresión/replicación específico para células que no actúa en las células adultas normales, y que puede inducir la replicación vírica mediante las etapas siguientes: obtener una región reguladora transcripcional de la iniciación, en las células, de un gen humano de la calponina que se exprese específicamente en las células tumorales específicas y en las células musculares lisas; dicha región está integrada corriente arriba que codifica el factor de transcripción necesario para iniciar la expresión del gen relacionado con la replicación vírica, (por tanto, con la replicación vírica); dicho gen se expresa en células específicas tales como las células tumorales malignas o en las células musculares lisas proliferantes de los nuevos vasos en los tumores, y en las lesiones de la vasoconstricción, sustituyendo este (gen) con un gen TK que (da lugar) a una enzima esencial para la replicación del ADN vírico. Se informa de que cuando el vector de expresión/replicación específico para células que se ha construido, se introdujo en un tejido tumoral maligno, las células tumorales y los músculos lisos proliferantes de los nuevos vasos en los tumores y en las lesiones de vasoconstricción, fueron "desorganizados" selectivamente (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001; solicitud de patente japonesa n° 2001-143999).

Los vectores HSV-1 que se han presentado hasta ahora, y que son de replicación específicamente celular, son el vector HSV-1 competente en la replicación, que posee un promotor de la calponina, de los que se ha informado (Cancer Res. 61, 3969-3977, 2001; solicitud de patente japonesa nº 2001-143999), y el vector HSV-1 competente en la replicación que es también un selector tumoral hepático que utiliza una albúmina impulsora según Martuza *et al.* de los Estados Unidos, tal como se ha mencionado previamente (J. Virol. 71, 5124-5132, 1997; patente US nº 5.728.379). Sin embargo, su cepa parental es un virus mutante HSV-1 d120 en el que los dos genes que codifican ICP4, un factor de transcripción esencial para la replicación viral, son defectuosos, estando LacZ ADNc corriente arriba, e ICP4 cADN corriente abajo del promotor, y el locus de la timidina cinasa (locus TK) alterado por recombinación homóloga. Por tanto, la expresión del gen LacZ que actúa como un índice en el procedimiento de purificación del vector, está bajo el control del promotor del gen TK.

El vector HSV-1 competente en la replicación en el que el ADN que codifica dicha timidina cinasa es defectuoso, no es sensible contra el aciclovir y el ganciclovir, que son agentes antiviral del herpes. Por tanto, el procedimiento para purificar el vector para un único clon se ha llevado a cabo mediante ciclos de repetición para la purificación de las placas, de la forma siguiente: una solución mezclada de virus después de recombinación homóloga, infectó unas células Vero E5 en las que se introdujo ICP4 cADN, aislándose múltiples, preferentemente algunas calvas mediante tinción azul, lo que indica la expresión de los genes LacZ en un ensayo de recubrimiento de la 5-bromo-4 cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) agarosa; en donde las células Vero E5 se infectaron otra vez en presencia de ganciclovir. Debe apreciarse que el procedimiento para la eliminación de los virus, en el que la recombinación en el locus TK no se ha realizado, no puede realizarse mediante medicamentos antiviral del herpes, es decir, los procedimientos para la purificación que se utilizan en los virus que carecen de un gen TK, no pueden aplicarse en la purificación de un vector de expresión/replicación específico para células que posea un gen TK.

Además, es imposible aislar una única placa en el estadio inicial de cribado, en el procedimiento de ensayo de recubrimiento de la X-gal agarosa. Además, en este procedimiento, en el momento en el que la agarosa es recubierta, la división y proliferación de las células se detiene, así como la replicación del virus, no aumentando entonces la cantidad de partículas virales. En este procedimiento, en el caso de un vector competente en la replicación que posee un gen LacZ que se expresa mediante un promotor con una actividad más intensa que el promotor del gen TK, por ejemplo, mediante el promotor del gen de la ribonucleótido reductasa (RR), si la capacidad de replicación del vector por sí mismo no es alta y el vector se tiñe de azul al mismo nivel que el del vector competente en la replicación que posee un gen LacZ que se expresa mediante el promotor del gen TK, el número de virus por célula deberá ser escaso. Por esta razón, es difícil aislar el vector con capacidad de replicación para al próximo cribado.

Además, como un vector de expresión/replicación específico para células, cuando un ICP4 cADN se une al gen opcional insertado corriente abajo del IRES (de entrada sitio ribosómico interno) (puede preferentemente ejemplificarse un cADN que expresa una Proteína Verde Fluorescente que muestra fluorescencia), el gen opcional mencionado anteriormente se expresa bajo el control de una región específico-celular transcripcional reguladora de la iniciación. Así, resulta posible el cribado que utiliza la expresión de ambos genes, el gen opcional y el gen LacZ, como un índice, descubriéndose que el vector viral en el que tiene lugar con éxito la recombinación homóloga en el sitio deseado, puede separarse más definitiva y rápidamente.

Además, se descubrió que un vector en el que la recombinación objetiva, en que tiene lugar que ICP4 se exprese bajo el control de un promotor específico celular, puede ser seleccionado y concentrado mediante el procedimiento siguiente: en el primer cribado después de la recombinación homóloga, una solución vírica después de esta recombinación homóloga, que incluye un vector de expresión/replicación específico para células, infecta una célula que no expresa ICP4, en la que el promotor del gen que se expresa específicamente en la célula, es decir, la región transcripcional reguladora de iniciación, puede activarse o infecta una célula que no expresa ICP4 y que expresa dicho gen, en la que el virus anteriormente mencionado se replica y prolifera; entonces, la expresión del gen que se integra en el vector hace que actúe como un índice para purificar hasta que se obtenga un único clon mediante dilución limitante. Además, un vector de expresión/replicación específico para células en el que la timidina cinasa se conserva, puede inactivarse y extinguirse con sus células infectadas mediante el tratamiento con aciclovir y ganciclovir, descubriéndose que constituye una excelente propiedad para las medidas de seguridad y prevención de la expansión inesperada de la infección del virus. Mientras, los ejemplos de la invención US nº 5.728.379, que es un vector HSV-1 específico celular de replicación, en el que la timidina cinasa es defectuosa, y de la invención de la previa solicitud de patente japonesa nº 2001-143999 previamente registrada, pueden considerarse no aplicables a las terapias en el hombre. Además, se confirmó mediante un sistema de cultivo celular *in vitro* o de un sistema de experimentación animal que el vector de expresión/replicación específico para células posee un efecto terapéutico contra el histiocitoma fibroso maligno (MFH), que actualmente aparece muy frecuentemente entre los sarcomas de tejidos blandos, el tumor estromático gastrointestinal (GIST), que aparece muy frecuentemente entre el sarcoma gastrointestinal humano, y el mioma uterino que aparece muy frecuentemente en el ámbito de la ginecología.

La presente descripción se refiere a: un vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre células adultas normales, en el que una región transcripcional reguladora de iniciación de un gen, que se expresa específicamente en la célula, se integra corriente arriba de un gen predeterminado, y un gen de la timidina cinasa que existe en dicho vector de expresión/replicación específico para células, se utiliza para suprimir la replicación en un período deseado ("1"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células

normales adultas según "1", en el que la región transcripcional reguladora de la iniciación del gen que se expresa específicamente en la célula, es una región que incluye la secuencia de bases que se muestra en SEC. ID. nº 1 ("2"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas, según "2", en el que la región que incluye la secuencia de bases que se muestra en SEC. ID nº 1, es una región que incluye un promotor del gen de la calponina humana, que comprende una secuencia de bases que se muestra en SEC. ID nº 2 ("3"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según "3", en el que la región que incluye una secuencia de bases que se muestra en SEC. ID. nº 2., es una región que incluye una secuencia de bases que se muestra en SEC. ID. nº 3 ("4"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según "1", en el que la región transcripcional reguladora de la iniciación, del gen que se expresa específicamente en la célula, comprende una secuencia de bases en la que una o algunas bases están suprimidas, sustituidas o añadidas a una secuencia de bases representada por SEC. ID. nº 1, SEC. ID. nº 2 o SEC. ID. nº 3, siendo una región que incluye una secuencia de bases que posee una actividad de control de iniciación de la transcripción ("5"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "5", en el que un potenciador se integra corriente arriba de la región transcripcional reguladora de la iniciación ("6"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas, según "6", en el que el potenciador es un potenciador 4F2 ("7"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "7", en el que un ADN que codifica una proteína deseada distinta de la del gen predeterminado, se une corriente abajo en el gen predeterminado, y expresa la proteína deseada bajo el control de dicha región transcripcional reguladora de la iniciación "8"; el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según "8", en el que el ADN que codifica la proteína deseada, se une al gen predeterminado mediante un IRES (sitio de entrada interno ribosómico) ("9"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "9", en el que el ADN que codifica la proteína deseada constituye un gen relacionado con el estímulo apoptótico ("10"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "9", en el que el ADN que codifica la proteína deseada es un ADN que codifica una proteína que posee una acción supresora de la angiogénesis ("11"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "9", en el que el ADN que codifica la proteína deseada es un ADN que codifica una proteína que posee una acción supresora contra las metástasis cancerosas ("12"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "9", en el que el ADN que codifica la proteína deseada es un ADN que codifica una proteína que posee una acción supresora contra el desarrollo canceroso ("13"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "13", en el que el gen predeterminado es un gen relacionado con la replicación vírica ("14"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según "14", en el que el gen relacionado con la replicación vírica es ICP4 o E1A ("15"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "15", en el que el vector de expresión/replicación es un vector viral ("16"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según "16", en el que el vector viral es un vector del virus herpes simple (vector HSV) o un vector adenovírico ("17"); el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "15", en el que el vector es específico para las células tumorales, específico para las células musculares lisas proliferantes en la neovascularización tumoral específico para las células mesangiales proliferantes en la glomerulonefritis; o específico para los miofibroblastos proliferantes en la fibrosis ("18"); y el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "18", en el que un ADN que codifica la ribonucleasa reductasa es suprimido ("19").

Además, la presente descripción se refiere únicamente a título de ejemplo a: un procedimiento para la expresión/replicación de un gen, proteína o péptido de un vector de expresión/replicación específico para células, que no actúa sobre las células normales adultas, en el que el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas, según cualquiera de "1" a "19", se introduce en las células y tejidos de un organismo, expresándose y replicándose entonces ("20"); un procedimiento para suprimir la expresión/replicación de un gen, proteína o péptido de un vector de expresión/replicación específico para células, que no actúa sobre las células normales adultas, en el que el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "19", se introduce en las células y tejidos de un organismo, expresándose y replicándose entonces, y, en un período de tiempo más tardío, suprimiéndose la expresión/replicación del vector de expresión/replicación específico para células ("21"); el procedimiento para suprimir la expresión /replicación de un gen, proteína o péptido de un vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas a "21", en el que la supresión del vector de expresión/replicación específico para células es una supresión que utiliza medicamentos antivirales que incluyen el aciclovir y el ganciclovir ("22"); un procedimiento para detectar la distribución *in vivo* de un vector de expresión/replicación específico para células, que no actúa sobre las células normales adultas, en el que el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas según cualquiera de "1" a "19", se introduce en las células y tejidos de un organismo, expresándose y replicándose entonces, y, determinándose mediante dicho vector de expresión/replicación la actividad timidina-cinásica ("23"); y el procedimiento para detectar la distribución *in vivo* de un vector de expresión/replicación específico para células, que no actúa sobre las células normales adultas según "23", en el que la determinación de la actividad timidina-cinásica se lleva a cabo mediante tomografía de emisión de positrones, utilizando un FIAU derivado del uracilo marcado

con ¹²⁴I ("24").

Todavía la presente descripción se refiere además al procedimiento según cualquiera de "20" a "24", en el que, únicamente a título de ejemplo, las células y tejidos en el organismo son tejidos tumorales, tejidos de vasoconstricción linfáticos o vasculares, tejidos nefríticos o tejidos fibróticos ("25"): un medicamento terapéutico que comprende el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre células normales adultas según cualquiera de "1" a "19" ("26"); el medicamento terapéutico según "26", en el que el medicamento terapéutico está destinado contra tumores malignos, fibrosis, lesiones vasculares proliferantes o glomerulonefritis proliferante ("27"); el medicamento terapéutico según "27", en el que el medicamento terapéutico está destinado contra el histiocitoma fibroso maligno, el tumor estromático gastrointestinal o el mioma uterino ("28"); un procedimiento terapéutico para la fibrosis y el tumor maligno, en el que el vector específico celular de expresión/(replicación que no actúa sobre las células normales adultas, según cualquiera de "1" a "19", se introduce en los tejidos fibróticos incluyendo al hígado y al pulmón, o a los tejidos tumorales malignos, incluyendo el cáncer mamario, el cáncer gástrico y el cáncer pancreático, alterándose selectivamente, entonces, un miofibroblasto proliferante como resultado de la replicación vectorial, y de la expresión de un gen, proteína y péptido ("29"); el procedimiento terapéutico para la fibrosis y el tumor maligno según "29"; en el que su diana es el histiocitoma fibroso maligno, el tumor estromático gastrointestinal o el mioma uterino ("30"); un procedimiento terapéutico para la lesión vascular proliferante, en el que el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas, según "1" a "19", se introduce en los tejidos de vasoconstricción linfática o en los vasos sanguíneos o en los tejidos arterioescleróticos, y en los que presentan retinopatía diabética, alterándose entonces selectivamente las células musculares lisas proliferantes o las células perivasculares como resultado de la replicación de un vector, y de la expresión de un gen, proteína o polipéptido ("32"); el procedimiento terapéutico según cualquiera de "29" a "32" en el que el vector específico celular de replicación se administra en una vena o arteria ("33"); el procedimiento terapéutico según cualquiera de "29" a "33", en el que la expresión/replicación del vector de expresión/replicación específico para células se suprime en un período de tiempo deseado ("34"); un procedimiento para producir un vector de expresión/replicación específico para células, en el que una solución vírica después de la recombinación homóloga, incluyendo el vector de expresión/replicación específico para células según cualquiera de "1" a "19", se infecta en una célula, en el que la región transcripcional reguladora de la iniciación de un gen que se expresa específicamente en la célula, puede activarse, o una célula que expresa dicho gen, utilizándose la expresión de un gen integrado en el vector como un índice para purificar un único clon, limitando la dilución sin utilizar el ensayo de recubrimiento de agarosa ("35"), y el procedimiento para producir el vector de expresión/replicación específico para células según "35", en el que la célula es una célula que no expresa ICP4 ("36").

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 incluye una fotografía que representa el procedimiento de construcción de d12-CALP Δ RR y de su estructura. La vista izquierda representa los resultados de la transferencia Southern, en la que pKpX2 (fragmento XhoI de ICP6) y el fragmento StuI-XhoI de ICP6 se utilizan como sondas marcadas con DIG. d120 es una cepa parental en la que se lleva a cabo la recombinación homóloga, siendo un mutante derivado de la cepa KOS, en la que ambos genes ICP4 son defectuosos. En hrR3, ICP6 se suprime como resultado de introducir un gen LacZ en el sitio BamHI del gen de la ribonucleótido reductasa (ICP6) de la cepa KOS (pKX2 β G3), que es una cepa de tipo salvaje.

La figura 2 incluye una fotografía que representa la actividad citolítica selectiva de d12-CALP Δ RR contra las células tumorales malignas positivas a la calponina (liomiosarcoma SK-LMS-1) *in vitro*. La vista izquierda superior representa la expresión del ARNm de calponina mediante RT-PCR, encontrándose casi ninguna calponina que se exprese en las células del osteosarcoma OST. La vista de la derecha representa una tinción X-Gal de la placa.

La figura 3 representa la replicación de d12-CALP Δ RR en las células tumorales malignas positivas a la calponina (liomiosarcoma SK-LMS-1) *in vitro* con tinción X-Gal que indica la expresión del gen LacZ, y una fotografía de la proteína EGFP mediante un microscopio de fluorescencia, que se expresa bajo el control de un promotor de la calponina. Pueden observarse muchas células que expresan tanto LacZ como EGFP.

La figura 4 incluye una fotografía que representa la replicación de d12-CALP Δ RR y la sensibilidad del ganciclovir con respecto a la actividad citolítica en las células Vero E5, en las que se introdujeron las células tumorales malignas positivas a la calponina (liomiosarcoma SK-LMS-1) al ICP4 cADN *in vitro*. La vista de la izquierda es una comparación con hrR3, es conocido que es hipersensible al ganciclovir. La vista de la derecha es una comparación con d12.CALP defectuoso en timidina cinasa (solicitud de patente japonesa nº 2001-143999), que indica la observación de la actividad citolítica bajo la presencia de 1 μ g/ml de ganciclovir. d12.CALP no es sensible al ganciclovir.

La figura 5 es una fotografía que muestra la expresión del ARNm de calponina y del ensayo de fragmentación celular o del ensayo *in vitro* de replicación vectorial. (a) muestra la expresión del ARNm de calponina (h1) en el sarcoma humano (histiocitoma fibroso maligno). (b) muestra la tinción de XGal de la placa cuando se infectó el vector d12-CALP Δ RR a un tumor, a 0,01 MOI.

La figura 6 es una fotografía que muestra el ensayo de fragmentación celular y el ensayo *in vitro* de replicación vectorial. Muestra la tinción X-Gal de la placa cuando un vector d12-CALP Δ RR infecta (a) células GIST con 0,01 MOI, (b) a células GIST con 0,1 MOI, (c) a células de un mioma uterino con 0,01 MOI, (d) a células de un mioma uterino con 0,1 MOI, respectivamente.

5

La figura 7 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral contra un tumor subcutáneo trasplantado a ratones desnudos *in vivo*.

La figura 8 es una fotografía que muestra el análisis de la replicación y del efecto antitumoral en una metástasis tumoral pulmonar *in vivo*, mediante la administración intravenosa de un vector d12-CALP Δ RR.

10

La figura 9 es una fotografía que muestra el efecto terapéutico de un tumor pulmonar humano metastásico mediante tres administraciones intravenosas del vector d12-CALP Δ RR *in vivo*.

15

20

25

30

En cuanto al vector de expresión/replicación específico para células de la presente descripción que no actúa en células normales adultas, no existe una limitación particular, siempre que no actúe en estas células normales adultas, y en las que una región transcripcional reguladora de iniciación de un gen que se exprese específicamente en ellas, se integre corriente arriba de un gen predeterminado, en el que el gen de la timidina cinasa que se encuentra en el vector de expresión/replicación específico para células, se utiliza para suprimir su replicación en un período deseado. Sin embargo, resulta preferido que dicho vector de expresión/replicación resulte específico para las células tumorales, para las células musculares lisas proliferantes en la angiogénesis tumoral, para las células musculares lisas en la lesión vascular proliferante, para las células mesangiales proliferantes en la glomerulonefritis, o para los miofibroblastos proliferantes en la fibrosis. Como región transcripcional reguladora de la iniciación del gen que se expresa específicamente en las células anteriormente mencionadas, puede resultar ejemplificativa una región promotora de un gen que se exprese específicamente en las células, o una región parcial de dicho promotor, y más específicamente, los ejemplos incluyen: una región que comprende una secuencia de bases desde -260 a -219 de un promotor del gen de la calponina que se muestra en SEC. ID. n° 1, preferentemente un promotor del gen de la calponina humana, que incluye una secuencia de bases que se muestra en SEC. ID n° 2; más preferentemente, un promotor del gen de la calponina humana que incluye una secuencia de bases que se muestra en SEC. ID n° 3, y una región que incluye una parte de su gen estructural. Además, como región transcripcional reguladora de la iniciación de un gen que se expresa específicamente en las células, puede resultar ejemplificativa una secuencia de bases en la que una o algunas bases son suprimidas, sustituidas o añadidas a la secuencia de bases mencionada anteriormente representada por SEC. ID n° 1, SEC. ID n° 2 o SEC. ID n° 3, que poseen una actividad reguladora de la iniciación transcripcional, por ejemplo, una región que incluya una región homóloga con respecto a un promotor de la calponina derivada del ratón, rata y cerdo.

35

40

En cuanto a la región transcripcional reguladora de la iniciación de un gen que se expresa específicamente en las células, pueden utilizarse regiones distintas de las que se han mencionado anteriormente cuando las células lisas musculares proliferantes se establecen como diana para el ataque, como la región promotora del gen SM22a (la secuencia de -480 a -26 del gen SM22a humano; y su región homóloga para el gen SM22a derivado del ratón, rata, u otros mamíferos), registradas con los números D84342-D84344 en GenBank; y cuando las células endoteliales se establecen como diana para el ataque, pueden utilizarse una región promotora de Flk-1 o una región promotora de los genes específicos de las células endoteliales, tales como el gen Flt-1. En estos casos, una región que incluya parte de un gen estructural, puede también considerarse como una región que puede actuar como región transcripcional reguladora de la iniciación.

45

50

Resulta preferido relacionar un potenciador que active significativamente la transcripción corriente arriba de una región transcripcional reguladora de la iniciación de un gen que se exprese específicamente en las células anteriormente mencionadas. Como para dicho potenciador no existe una limitación específica con tal que sea un potenciador tal como el de un gen temprano adenovírico, uno del virus Moloney de la leucemia murina con largas repeticiones terminales, un potenciador del gen H2A de la histona, un potenciador de la inmunoglobulina, un potenciador del gen de la insulina, un potenciador del gen c-fos, un potenciador del gen del receptor antigénico de las células T, un potenciador del gen de la creatina cinasa miopático, un potenciador transcripcional de la cadena pesada humana 4F2 y similares. Sin embargo, en el caso que la región transcripcional reguladora de iniciación de un gen que se exprese específicamente en las células, sea una región que incluya una secuencia de -260 a + 73 de un promotor de un gen de la calponina, resulta preferido un potenciador 4F2 ya que potencia significativamente la eficacia de la transcripción, tal como el potenciador transcripcional humano 4F2 de cadena pesada (SEC. ID n°4), que es un potenciador de un gen 4F2 de cadena pesada, que es una glicoproteína de membrana, del tipo II, y que, interviniendo sólo en la estructura transmembranosa, se cree es un factor activante de un aminoácido transportador).

55

En cuanto al gen predeterminado que vaya a utilizarse en la construcción del vector de expresión/replicación específico para células, que no va a actuar en las células normales adultas de la presente descripción, no existe una limitación particular, siempre que sea un gen necesario para iniciar o mantener la replicación viral. Pueden resultar ejemplificativos un gen asociado con la replicación viral, tal como el gen E1A del adenovirus, el gen ICP6 (ribonucleótido reductasa) y similares, y entre ellos, pueden resultar preferentemente ejemplificativos un gen (ICP 4) que codifica un factor de transcripción necesario para iniciar la replicación del virus herpético. Además, como para estos genes, puede

existir un gen en el que una parte o la totalidad del gen estructural original, localizado corriente abajo de la región transcripcional reguladora de iniciación, se una, en el marco de lectura, con el gen predeterminado mencionado anteriormente, pudiendo resultar ejemplificativo específicamente un ADN que codifique una proteína de fusión de una parte del lado del N-terminal de la proteína calponina, con la proteína ICP4.

5 En cuanto al vector de expresión/replicación específico para células que no actúa en las células normales adultas de la presente descripción, resulta ejemplificativo un vector de expresión/replicación específico para células, en el que un ADN que codifica una proteína deseada, que es distinta se une además corriente abajo del gen predeterminado, pudiendo expresar la proteína deseada bajo el control de dicha región transcripcional reguladora de la iniciación. Específicamente, puede resultar preferentemente ejemplificativo un vector de expresión/replicación específico para células, en el que el ADN que codifica la mencionada anteriormente deseada proteína, se une a un gen predeterminado mediante IRES (sitio interno de entrada ribosómico); descripción de la patente US nº 4.937.190). Un promotor del gen SM22a, un homólogo de la calponina, puede también unirse a dicho sitio IRES. Estos inventores son los primeros en clonar una secuencia promotora SM22a e informar de ello (J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997), y la secuencia de bases de la parte importante para la actividad promotora (fragmento BamH I-DraI de 445 pares de bases de la región promotora humana SM22a) se indica como SEC. ID. nº 5. Cuando el promotor CMV y el potenciador del promotor CAG se utilizan en vez de IRES, un gen que escapa del control del promotor de la calponina y codifica la proteína deseada, puede también expresarse en una célula de forma no selectiva.

20 En cuanto al ADN que codifica dicha proteína deseada mencionada anteriormente, pueden resultar específicamente ejemplificativos un gen relacionado con la promoción de la apoptosis, un ADN que codifica una proteína que presenta una acción para suprimir la neoangiogénesis, un ADN que codifica una proteína que posee una acción de supresión de las metástasis cancerosas, un ADN que codifica una proteína que posee una acción de supresión del cáncer y similares, pudiéndose unir más de dos, entre estos ADN. Los ejemplos específicos de los gen relacionados con la promoción de la apoptosis mencionada anteriormente, incluyen: genes que promueven la apoptosis tales como Bcl-xs, Bok/Mtd, Bcl-Gs/Bra, Bcl-GL, Bcl-Rambo, Hrk/DP5, Bik/Nbk/Blk, Bad, Bid, Bim/L S, EL/BodL, M, S, Noxa/APR, Puma y similares; ejemplos específicos del ADN que codifica una proteína que posee la acción de suprimir la neoangiogénesis, incluyen: ADN que codifica proteínas receptoras dominantes negativas tales como la angioestatina, endostatina, Flk-1 soluble, Flt-1 soluble, FLT4 soluble, Tie1, Tie2 y similares; ejemplos específicos para el ADN que codifica una proteína que posee la acción de suprimir las metástasis cancerosas, incluyen: un ADN que codifica una proteína tal como el inhibidor de la metaloproteasa (MMP) matricial, lactoferrina bovina (bLF) y similares; ejemplos específicos del ADN que codifica una proteína que posee una acción para suprimir el cáncer, incluyen un ADN que codifica supresores del ciclo celular tales como p21, p16, p15 y similares, o supresores de la proliferación celular, tales como p53, Rb, IRF-1, APC y similares. Sin embargo, no se proporcionan de manera limitativa.

35 En cuanto al ADN que codifica la proteína deseada anteriormente mencionada, constituyen ejemplos un gen que codifica una proteína marcadora tal como EGFP cADN y el gen de la luciferasa, y un vector de expresión/replicación específico para células que puede expresar estas proteínas marcadoras es significativamente útil en el cribado y en la detección del vector de expresión/replicación y similares.

40 En cuanto a la estructura del vector viral utilizado para la construcción del vector de expresión/replicación específico para células, que no actuará en las células normales del organismo adulto, resulta preferido que, para ello, sea un vector que pueda expresarse mediante infección o introducción del gen en tales como osteosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, incluyendo liomiosarcoma, tumor estromático gastrointestinal (GIST), mesotelioma maligno, histiocitoma fibroso maligno (MFH), fibrosarcoma, meningioma maligno, mioma uterino, neurinoma y similares, o células musculares lisas proliferantes o células perivasculares del conjunto de los nuevos vasos sanguíneos tumorales. En cuanto a dicho vector, puede resultar ejemplificativo un vector de expresión derivado de un cromosoma, episoma, liposoma y virus. Sin embargo, los vectores virales que incluyen papovavirus tales como SV40, virus de la vacuna, adenovirus, vector viral adeno-asociado, virus de la difteria aviar, virus de la rabia, vector derivado de retrovirus, vector del virus herpes simple (vector HSV) y similares, siendo preferibles entre éstos, el vector HSV y el vector adenovírico, especialmente un vector HSV o un vector adenovírico condicionalmente competentes en la replicación, desde el punto de vista de la alta eficiencia de la expresión génica y de la actividad citotóxica específica con respecto a las células proliferantes, o similares. Utilizando, por ejemplo, un vector en el que el ADN que codifica la ribonucleótido reductasa se suprime, (como el vector HSV condicionalmente competente en la replicación), puede construirse, preferentemente, el vector de expresión/replicación específico para células de la presente descripción, que no actuará en las células normales adultas y que podrá controlar la replicación del vector, así como la expresión génica.

55 En cuanto al procedimiento para la expresión/replicación del vector de expresión/replicación específico para células que no actuará en las células normales adultas de la presente invención, no existe una limitación particular, siempre que sea un procedimiento para la expresión/replicación, en el que el vector de expresión/replicación específico para células que no actuará sobre las células normales adultas anteriormente mencionadas, se introduzca directamente en las células y tejidos de un organismo, preferentemente en un tejido en el que se desarrollen tumores tales como sarcomas en parte óseos o de tejidos blandos, liomiosarcoma, tumor estromático gastrointestinal, mesotelioma maligno, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma, meningioma maligno, neurinoma y similares, o en la vasoconstricción o arterial que se puede presentar después del emplazamiento de una endoprótesis vascular o del trasplante de un órgano, tejido nefrítico, tejido fibrótico, o un órgano que incluya estos tejidos, o a partir del sistema vascular que alimenta el

tumor, o se inyecte directamente en el vaso, utilizando una endoprótesis vascular o similar. Cuando a los músculos lisos proliferantes de los nuevos vasos sanguíneos tumorales se les considera dianas para el ataque, puede resultar ejemplificativa una introducción directa o inyección a partir del sistema vascular que alimente el tumor, cualquiera que sea el tipo de tumor sólido maligno. Además, como un procedimiento para la expresión/replicación o supresión de un gen, de una proteína o de un péptido del vector de expresión/replicación específico para células de la presente invención que no actuará sobre las células normales adultas, no existe una limitación particular, siempre que el vector celular específico de expresión/replicación que no actuará sobre las células normales adultas anteriormente mencionadas, se expresa/o replica introduciendo en las células y tejidos de un organismo mencionado anteriormente un medicamento antiviral tal como aciclovir, ganciclovir y similares, por ejemplo, utilizándolos posteriormente y en un período deseado. Además, en cuanto al agente terapéutico de la presente descripción, puede utilizarse cualquier tipo de agente, como un principio activo, siempre que incluya el vector de expresión/replicación específico para células que no va a actuar sobre las células normales adultas de la presente descripción, anteriormente mencionadas. Ejemplos específicos de dicho medicamento terapéutico incluyen un agente terapéutico contra las células y tejidos de un organismo, preferentemente los tumores malignos anteriormente mencionados, fibrosis, lesiones vasculares proliferantes, glomerulonefritis proliferante, y similares.

En cuanto al procedimiento terapéutico de la presente descripción para el tumor maligno y la fibrosis, proporcionado únicamente a título de ejemplo, no existe una limitación particular, siempre que sea un procedimiento en el que el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas de la presente descripción, se introduzca en los tejidos fibróticos, incluyendo la fibrosis pulmonar y la hepática y los tejidos tumorales malignos, incluyendo al cáncer mamario, al cáncer gástrico y al cáncer pancreático, expresándose entonces un gen, una proteína o un péptido. Particularmente resulta preferido un procedimiento en el que sólo el miofibroblasto proliferante sea selectivamente alterado, o un procedimiento en el que sólo las células musculares lisas proliferantes del conjunto de los nuevos vasos sanguíneos tumorales o de las células perivasculares sean selectivamente alteradas. En cuanto al procedimiento para la introducción en los tejidos en los que se desarrolla el tumor maligno, puede resultar preferentemente ejemplificativo un procedimiento para inyectar directamente el vector de expresión/replicación específico para células anteriormente mencionado en el tumor maligno, o un procedimiento para inyectar el vector de expresión/replicación específico para células en el tumor mediante el sistema vascular de perfusión, tal como la administración arterial o venosa y similares. En cuanto al procedimiento terapéutico para la lesión vascular proliferante de la presente descripción proporcionado únicamente a título de ejemplo, no existe una limitación particular, siempre que sea un procedimiento en el que el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa en las células normales adultas de la presente invención, anteriormente mencionado, se introduzca en una lesión de la vasoconstricción o en los tejidos arterioescleróticos y en los tejidos de retinopatía diabética, expresándose entonces un gen, una proteína o un péptido. Puede resultar preferentemente ejemplificativo un procedimiento en el que sólo las células musculares lisas proliferantes o las células perivasculares pueden alterarse selectivamente. Además, en cuanto al procedimiento para tratar la glomerulonefritis proliferante de la presente descripción, no existe una limitación particular siempre que sea un procedimiento en el que el vector de expresión/replicación específico para células, anteriormente mencionado, y que no actúe en las células normales adultas de la presente descripción, se introduzca en una lesión glomerulonefrítica, expresándose entonces un gen, una proteína o un péptido, y entre ellos, puede proporcionarse únicamente preferentemente a título de ejemplo, un procedimiento en el que sólo las células mesangiales proliferantes sean alteradas selectivamente. Además, los procedimientos terapéuticos de la presente descripción que se han mencionado anteriormente, y que se proporcionan únicamente a título de ejemplo, se caracterizan de forma muy importante porque la expresión/replicación del vector de expresión/replicación específico para células, se suprime en un período deseado, tal como después de la finalización de la terapia.

En cuanto al procedimiento de la presente descripción, para la detección de la distribución *in vivo* del vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas, el procedimiento de la presente descripción, se caracteriza porque el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas, mencionado anteriormente, se introduce en las células y los tejidos de un organismo, expresándose/replicándose entonces para detectar/determinar la actividad timidina cinasa mediante dicho vector de expresión/replicación específico para células. Específicamente, la distribución *in vivo* del vector de expresión/replicación específico para células puede detectarse administrando un derivado FIAU del uracilo marcado con ¹²⁴I al organismo, y detectando/determinando el ¹²⁴I mediante tomografía de emisión de positrones (Nature Med. 7, 859-863, 2001).

En cuanto al procedimiento para la producción del vector de expresión/replicación específico para células de la presente descripción, no existe una limitación particular, con tal que exista un procedimiento de cribado en el que una solución mezclada de virus después de una recombinación homóloga que incluya el vector de expresión/replicación específico para células que no actúa sobre las células normales adultas, de la presente descripción, anteriormente mencionado, infecte una célula, en el que la región transcripcional reguladora de la iniciación de un gen que se expresa específicamente en la célula puede activarse, o una célula que exprese dicho gen, preferentemente una célula que no exprese ICP4, utilizándose la expresión de un gen integrado en el vector como un índice para purificar un clon único mediante dilución limitante. Con el establecimiento del procedimiento para la producción del vector de expresión/replicación específico para células de la presente descripción, llevado a cabo mediante el cribado, puede obtenerse por primera vez el vector de expresión/replicación específico para células de la presente descripción, mencionado anteriormente, que no actúa sobre las células normales adultas.

Yamamura, H. *et al.* (Cancer Research 61, 3969-3977, 2001) describen un vector HSV de replicación condicionada, en el que el promotor de la calponina gobierna la expresión de ICP4.

5 El documento WO 02/092816 da a conocer un vector similar al de Yamamura, en el que el dominio transcripcional de regulación de la iniciación del gen humano de la calponina, que se expresa específicamente en las células, se obtiene y se une corriente arriba de un gen asociado a la replicación de un virus. Entonces, el producto unido se integra en un ADN viral para construir entonces un vector de replicación que muestra una expresión específica celular que no actuaría en las células normales en un adulto. El vector así construido se transfiere a las células tumorales malignas para, entonces, dañar selectivamente las células tumorales o las células musculares lisas proliferativas en el conjunto de los nuevos vasos tumorales.

10 Mineta *et al.* (Nature Medicine Vol. 1, nº 9, 938-943, 1995) dan a conocer un HSV (G207) doble mutante, para el tratamiento de los tumores cerebrales malignos, que es competente en la replicación para dividir células. Este mutante es hipersensible al ganciclovir y contiene un gen lacZ insertado en el gen ICP6.

15 Matuza, R.L. (J. Clinical Investigation, Vol. 105, nº 7, 841-846, 2000), considera la utilización de vectores virales obtenidos mediante ingeniería genética para la terapia tumoral, en la que los vectores proceden de HSV. Se da asimismo a conocer un vector que contiene una mutación en el gen U_L39, que codifica la gran subunidad de la HSV ribonucleótido reductasa.

Hunter *et al.* (J. Virol, Vol. 73, nº 8, 6319-6326, 1999), estudiaron la seguridad de la inoculación intracerebral del recombinante G0207 HSV en primates no humanos.

EXPOSICIÓN DE LA INVENCIÓN

20 La presente invención se refiere a un vector del virus herpes simple (HSV) que induce específicamente una expresión génica vírica y una replicación viral en una célula que expresa calponina y que es proliferante, que no se replica en las células normales adultas, y que puede suprimir su replicación en un momento deseado utilizando el gen de la timidina cinasa, donde el vector comprende un fragmento de ADN que comprende:

- 25
- (i) una región promotora del gen humano de la calponina, que comprende la secuencia nucleótida que se muestra en SEC. ID. nº 3;
 - (ii) el gen ICP4 que codifica un factor de transcripción esencial para la iniciación de una replicación del virus del herpes, que se integra corriente abajo de la región promotora del gen humano de la calponina;
 - (iii) el gen EGFP que se une corriente abajo del gen ICP4 mediante un sitio ribosómico interno de entrada; y
 - (iv) el gen LacZ que se integra corriente arriba de dicha región promotora del gen humano de la calponina,

30 y en el que este fragmento de ADN se inserta mediante recombinación en el locus del gen de la ribonucleótido reductasa de un vector HSV que comprende un gen endógeno de timidina cinasa y que carece de la función del gen endógeno ICP4,

y en el que las expresiones, tanto del gen LacZ como del gen EGFP, integrados en el vector, se utilizan como marcadores para identificar el vector HSV recombinante.

35 La presente invención se refiere asimismo al vector HSV según lo expuesto anteriormente, en el que un potenciador se integra corriente arriba de la región promotora del gen humano de la calponina.

La presente invención se refiere asimismo al vector HSV según lo expuesto anteriormente, en el que el potenciador es un potenciador 4F2.

40 La presente invención se refiere asimismo al medicamento terapéutico que comprende el vector HSV que se ha descrito anteriormente.

45 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para producir un vector HSV, tal como el que se ha descrito anteriormente, induciendo dicho vector específicamente una expresión génica viral y una replicación viral en una célula que expresa calponina y que es proliferante, que no se replica en las células normales adultas, y que puede suprimir su replicación en un momento deseado utilizando el gen de la timidina cinasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- (a) preparación de un fragmento de ADN que comprende:
- (i) una región promotora del gen humano de la calponina, que comprende la secuencia nucleótida representada por SEC. ID. nº 3;
 - (ii) el gen ICP4 que codifica un factor de transcripción esencial para la iniciación de una replicación del virus del herpes, que se integra corriente abajo de la región promotora del gen humano de la calponina;

50

- (iii) el gen EGFP que se une corriente abajo del gen ICP4 mediante un sitio ribosómico interno de entrada; y
- (iv) el gen LacZ que se integra corriente arriba de dicha región promotora del gen humano de la calponina,

- (b) preparación de recombinantes, mediante cotransfección con el vector HSV que comprende un gen endógeno de la timidina cinasa y que carece de la función del gen endógeno ICP4, junto con el fragmento de ADN en una célula, en la que una región promotora del gen humano de la calponina que comprende la secuencia nucleótida representada por SEC. ID. n° 3, puede activarse, o una célula que exprese el gen humano de la calponina; y
- (c) con el fin de cribar un vector HSV recombinante, en el que el fragmento de ADN se inserta mediante una recombinación homóloga en el locus del gen de la ribonucleótido reductasa del vector HSV, que comprende un gen endógeno de la timidina cinasa y que carece de la función del gen endógeno ICP4, seleccionar un clon único del vector HSV de entre los recombinantes mediante dilución limitada, sin utilizar el ensayo de recubrimiento de agarosa, utilizando las expresiones, tanto del gen LacZ como del gen EGFP, como marcadores.

La presente invención se explicará mediante los ejemplos siguientes:

EJEMPLO A (Materiales y Métodos)

A-1 (Células, métodos de cultivo, anticuerpos y virus)

La progenie celular del liomiosarcoma uterino humano SK-LMS-1 (HTB-88) y las células Vero (CCL-81) se obtuvieron de la American Type Culture Collection. La progenie celular OST (RCB0454) del osteosarcoma humano se obtuvo del RIKEN GENE BANK. Para las células Vero E5, las células Vero en las que el gen ICP4 se transfecta, se utilizaron las que proporcionó N. Deluca (University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh). Para la progenie celular del histiocitoma fibroso maligno humano (MFH-AI), se utilizó la que proporcionó el Dr. Yanoma del Kanagawa Prefectural Cancer Center. En cuanto a las células tumorales estromáticas gastrointestinales humanas (GIST) y las células del mioma uterino humano, se prepararon, de modo aséptico, las células focales a partir de la muestra quirúrgica, en la que la expresión de la proteína calponina se confirmó mediante inmunohistoquímica, tratándose con una solución de colagenasa (1 mg/ml; Sigma Cat. #C-9722), separándose las células del cultivo primario. Se utilizaron las que se utilizaron en el experimento de infección vectorial, en el que, en un medio RPMI 1640 se llevaron a cabo de 3 a 4 generaciones de subcultivo. SK-LMS-1 se cultivó en un medio Eagle MEM suplementado con piruvato sódico 1 mM. OST, las células Vero y las células Vero E5 se cultivaron en DMEM. MFH-AI se cultivó en medio RPMI 1640. Todos los medios contienen lo siguiente, respectivamente: suero fetal bovino termo-inactivado (Upstate Biotechnologies) con una concentración final del 10%; L-glutamina 2 mM; 100 unidades/ml de penicilina; y 100 µg/ml de estreptomina. Además, todas las células mencionadas anteriormente se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5%.

Las células mencionadas MFH-AI se inyectaron subcutáneamente en los flancos de seis ratones hembras atímicas de seis semanas de edad (BALB/c Slc-nu/nu) (Japan SLC), fijándose los tumores. Los ratones se sometieron a disección a los dos meses, tratando entonces con colagenasa (1 mg/ml; Sigma Cat. # C-9722) los cortes tumorales que se habían extraído asépticamente a partir de los focos pulmonares metastatizados, separándose entonces las células. Se inyectaron 1 x 10⁶ células en la vena de la cola de los seis ratones hembras atímicas de seis semanas de edad. Un mes después, las células tumorales individuales se separaron de los focos tumorales que se habían metastatizado otra vez a los pulmones, de la misma forma que se ha descrito previamente. Esta operación se repitió una vez más, estableciéndose la progenie celular MFH-AI-LM con una alta actividad metastásica para los pulmones.

El anticuerpo monoclonal para la proteína ICP4 HSV-1 o HSV-2 (clon n° 1101) se obtuvo a partir del Goodwin Institute for Cancer Research. Se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998). Según el protocolo del fabricante, para visualizar los anticuerpos unidos, se utilizó la quimioluminiscencia (ECL; Amersham Pharmacia Biotech). Además, fueron proporcionados por los Drs N. Deluca y S. Weller (University of Connecticut Health Center, Farmington) el mutante HSV-1 d120, defectuoso en ICP4 (J. Virol 56, 558-570, 1985) y el mutante HSV-1 hrR3, defectuoso en ICP6 (ribonucleótido reductasa), que se generaron mediante infecciones de escasa multiplicidad llevadas a cabo en las células Vero E5 o en las células Vero, en las que se había introducido ICP4, respectivamente.

A-2 (Preparación ARN y análisis RT-PCR)

Se extrajo el ARN total a partir de las células cultivadas o de los tejidos, utilizando el equipo de extracción Isogene ARN (Nippon Gene), y se sometió a análisis RT-PCR semicuantitativo, tal como se ha descrito anteriormente (Int. J. Cancer 79, 245-250, 1998). En cuanto a las condiciones para la amplificación PCR, se repitió 30 veces un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, hibridización a 60°C durante 30 segundos, y reacción de prolongación a 72°C durante 90 segundos. Para amplificar los fragmentos de ADN de 671 pares de bases y de 731 pares de bases, se utilizaron, como cebadores de la calponina humana el 5'-gagtggtcagacggaacttcagcc-3' [cebador directo 1 (FP1); nt # 10-33 GenBank D17408; SEC. ID. n° 6] y 5'-gtctgtgccagctggggtc-3' (cebador inverso 1 (RP1); nt # 660-680; SEC. ID. n° 7); y como cebador de la GADPH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) como un control,

5'-cccatcaccatcttccagga-3' [cebador directo 2 (FP2); nt # 342-360; SEC. ID. n° 8] y 5'-ttgtcataccaggaaatgagc-3' [cebador inverso 2 (RP2); nt # 1052-1070; ; SEC. ID. n° 9], respectivamente.

A-3 (Aislamiento del promotor de la calponina humana)

5 Clones genómicos que contenían la región corriente arriba 5' del gen humano de la calponina, se aislaron mediante el cribado de una biblioteca fágica λ EMBL3 según el procedimiento que se ha descrito anteriormente (J. Biochem. 120, 18-21, 1996). Los fragmentos 5' que se suprimieron, p-1159Luc, p-385Luc, p-343Luc, p-310Luc, p-299Luc, p-288Luc, p-260Luc, p-239Luc, p-219Luc, p-201Luc, p-176Luc, p-153Luc, se generaron mediante amplificación PCR, con el clon genómico como matriz. Los números indican el extremo 5' de los fragmentos ADN corriente arriba del codon ATG de iniciación translacional, al que se hace referencia a continuación, en la memoria, como +1. Estos fragmentos suprimidos poseen un extremo común 3' en la posición +73. La secuencia nucleótida de los fragmentos clonados se determinó utilizando un secuenciador de ADN DQS-2000L (SHIMADZU) según el protocolo del fabricante, y se confirmó que la secuencia era idéntica a la secuencia (base de datos DDBJ/GenBank™/EMBL; n° de registro D85611), tal como se ha descrito anteriormente (J. Biochem. 120, 18-21, 1996). La región reguladora de mínima expresión (-260 a +73) se identificó mediante el procedimiento que se ha descrito previamente (Cancer. Res. 61, 3969-3977, 2001).

A4 (Transfección y ensayo de luciferasa)

20 Las células que se cultivaron anteriormente, se dividieron y se sembraron en una placa 24 horas antes de la transfección. Se transfectaron células (5×10^4) inyectando 1,2 μ g del plásmido promotor, 0,3 μ g del plásmido que contenía pCAGGS/ β -gal, y 3,75 μ l del reactivo para transfección FuGENE™6 (Roche) en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, según el protocolo del fabricante. Después de 24 horas tras la transfección, las células se recuperaron en 100 μ l/pocillo del tampón de lisis celular (PicaGene™ Luciferase Assay System, Toyo Ink). Después de centrifugación a 4°C a 12.000 g durante 5 minutos, se utilizaron los sobrenadantes (20 μ l o 30 μ l) para el ensayo de luciferasa y β -galactosidasa, respectivamente. La actividad de la luciferasa se midió utilizando un lector de luminiscencia BLR-201 (Aloka). El ensayo de la β -galactosidasa se llevó a cabo utilizando un sistema de ensayo de la β -galactosidasa (Promega) que seguía el descrito anteriormente (J. Biochem. (Tokyo) 122, 157-167, 1997). Todos los experimentos se repitieron por lo menos tres veces para confirmar su capacidad de reproducción. Ensayando la actividad β -galactosidásica de los extractos celulares, se determinó la eficiencia transfectora, y, según su valor, se corrigieron las actividades luciferásicas (unidades de luz). Comparando la expresión del gen pSV2-Luc que contenía el potenciador de SV40 y el promotor SV40, se evaluó la eficiencia transfectora de distintas progenies celulares. Los datos se expresan como porcentaje para la absorbancia normalizada \pm S.E. con respecto a los valores de pSV2-Luc.

A-5 (Preparación de los virus)

35 Un fragmento Sall-MseI con su extremo romo, de 4,1 kb, (proporcionado por el Dr. Hayward, Johns Hopkins School of Medicine), procedente de pGH108 (J. Virol, 558-570, 1985), que contenía la región codificante de ICP4, se insertó en el sitio BamHI (también con su extremo romo), corriente abajo del promotor de la calponina humana de 333 pares de bases (-260 a +73), clonándose en el plásmido pAMP1, y, en el sitio SmaI de dicho plásmido, se subclonó un fragmento NotI de 444 pares de bases del potenciador transcripcional 4F2 humano de cadena pesada (Mol. Cell Biol. 9, 2588-2597, 1989), (proporcionado por el Dr. Leiden, Harvard Medical School). El sitio HindIII en el lado 3' del plásmido pAMP1/CALP-ICP4 se transformó en romo, el plásmido pIRES2-EGFP (Clontech) se sometió a doble digestión con BamHI y AflII, y el fragmento resultante de 1576 pares de bases, se subclonó. Este fragmento BamHI-AflII está compuesto de una secuencia IRES (descripción de la patente US n° 4.937.190) y de la secuencia EGFP (descripción de las patentes US n° 5.625.048 y n° 5.804.387), así como de la señal poly A derivada de SV40. Además, el fragmento de 6,7 kb obtenido mediante digestión doble del plásmido pAMP1/CALP-ICP4-IRES2-EGFP, utilizando EcoRI y SphI, se transformó en romo, y se subclonó en el sitio romo StuI del vector recombinante pKX2 β G3 (pKX2 β G3/CALP-ICP4-IRES2-EGFP). El vector recombinante pKX2 β G3 (proporcionado por el Dr. Weller de la University of Connecticut) está compuesto de un fragmento XhoI de 2,3 kb de la secuencia codificante ICP6 (pKpX2) en la estructura de pUC19, y la secuencia del LacZ de *Escherichia coli* de 3,0 kb, se inserta en el sitio BamHI de la secuencia ICP6 (J. Virol. 62, 196-205, 1988).

50 A continuación, el plásmido pKX2 β G3/CALP-ICP4-IRES2-EGFP se linearizó en el sitio XhoI (uno en el que el sitio XbaI en el lado 5' de la secuencia ICP6 de pKX2 β G3 y del sitio HindIII en el lado 3' de la secuencia ICP6 están ambos sustituidos por el sitio xhoI), y el pRR Δ -CALP-ICP4-IRES2-EGFP, en el cual la secuencia pUC19 es eliminada y el ADN vírico d120, se cotransfectaron a un cultivo monocapa subconfluyente de células Vero E5 transfectadas con cADN ($2,5 \times 10^5$ /pocillo) en una placa de cultivo tisular de 6 pocillos, utilizando Lipofectamine™ (GIBCO/BRL), según el protocolo del fabricante. Tres horas después de la transfección, se añadió 1 ml de la solución del cultivo FBS/DMEM al 20%, y las células transfectadas resultantes se cultivaron en dicha solución de cultivo (FBS/DMEM al 10%), que contenía 0,5 mg/ml del ácido 4-hidroxiacetilbenzoico (HMBA) durante 96 horas después de la transfección. Después de confirmación de la formación de la placa, el cultivo se llevó a cabo posteriormente durante 24 horas con FBS/DMEM al 10% sin HMBA. Las células se suspendieron en 500 μ l/pocillo de tampón enfriado para virus (20 mM Tris-HCl que contenía 150 mM de NaCl; pH 7,5), congelándose entonces para conservarlo.

El tratamiento de congelación y descongelación con la combinación de un tratamiento con ultrasonidos (30

segundos 3 veces) se llevaron a cabo en tres ocasiones, y las células suspendidas en la solución mencionada anteriormente se lisaron. La solución de células suspendidas se diluyó poco a poco y se infectó en el cultivo monocapa subconfluente de las células SK-LMS-1 en una placa de cultivo tisular provista de 96 pocillos. Después de la infección, se llevó a cabo el cultivo durante 96 horas en 100 μ l/pocillo de FBS/DMEM al 1%, que contenía 11,3 μ g/ml de IgG humana (Jackson ImmunoResearch Lab). Los pocillos en los que se confirmó la formación de las calvas se rastrearon, considerando como un índice la expresión de EGFP bajo un microscopio de fluorescencia. Las células SK-LMS-1 del cultivo monocapa del pocillo, que contenían calvas EGFP positivas, se suspendieron en 100 μ l de dicha solución de cultivo, y entre ellas, 6 μ l se utilizaron para determinar la actividad enzimática β -galactosidásica con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) como sustrato, utilizando un sistema de ensayo enzimático de la β -galactosidasa (Promega). La solución de células suspendidas SK-LMS-1, de un pocillo que era positivo con respecto a la actividad enzimática β -galactosidásica, se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm, volviéndose a suspender el sedimento en 100 μ l/pocillo del tampón enfriado para virus. La dilución limitante, la infección y la determinación de la actividad enzimática β -galactosidásica, que se llevaron a cabo de idéntica forma, utilizando una placa de cultivo tisular de 96 pocillos, se repitieron dos veces con las células Vero E5, y un vector viral recombinante d12.CALP- Δ RR se purificó como una única calva. Después de la purificación del ADN vírico, se sometió a digestión con la enzima de restricción XhoI, y la recombinación en el locus de la ribonucleótido reductasa (locus ICP6 o RR) fue confirmada mediante transferencia Southern con el fragmento XhoI (2,3 kb) del ICP6 cADN como una sonda (figura 1).

Los virus se prepararon infectando las células Vero E5 en 10 a 20 recipientes de matraces de cultivo tisular 150 cm² (IWAKI CLASS) y células recuperables que después de 48 horas, se separaron. Las células se recuperaron mediante centrifugación a 4°C durante 5 minutos a 400 x g, suspendiéndose entonces en 10 ml de tampón enfriado para virus (20 mM Tris-HCl que contenía 150 mM NaCl; pH 7,5). El tratamiento de congelación y descongelación con la combinación de utilización de los ultrasonidos (30 segundos por 3 veces), se llevó a cabo tres veces y las células que se mencionaron anteriormente, se lisaron. Después de la centrifugación a 4°C durante 5 minutos, a 1.500 x g, el sobrenadante se centrifugó ulteriormente a 4°C durante 45 minutos a 15.000 g. El sedimento resultante se volvió a suspender en el tampón enfriado para virus, y los títulos del vector viral d12.CALP- Δ RR se determinaron mediante el ensayo de la calva en las células Vero E5.

A-6 (Ensayo de citolisis *in vitro* y ensayo de crecimiento mediante etapas únicas)

Un cultivo monocapa subconfluente de células en una placa de cultivo tisular con 6 pocillos fue infectado con el vector viral d12.CALP- Δ RR, con una multiplicidad infectiva (MOI) de 0,1 a 0,001 (pfu/célula), en FBS/PBS al 1%, termoinactivado. Dichas células infectadas se incubaron a 37°C durante 1 hora, y entonces, se cultivaron en un medio que contenía FBS al 1% y 11,3 μ g/ml de IgG humana (Jackson ImmunoResearch Lab.). Cuarenta y ocho horas después de la infección, se contó el número de calvas/pocillo. Para el ensayo de crecimiento mediante etapas únicas, cultivos monocapa de células SK-LMS-1 o de células OST en placas de cultivo tisular con 12 pocillos, (2 x 10⁵ células /pocillo) se infectaron con el vector viral d12.CALP- Δ RR con una multiplicidad infectiva (MOI) de 0,1 en FBS/PBS al 0,1%. El inóculo viral se eliminó en 1 hora, y las células anteriormente mencionadas se incubaron en dicho medio. Las células infectadas se recuperaron de los pocillos en un período predeterminado de tiempo (12 horas, 24 horas y 48 horas), utilizando 100 μ l del tampón vírico. La suspensión celular (1 μ l) se diluyó hasta 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵, determinándose entonces la actividad formadora de la calva de virus sobre las células Vero E5.

Además, con el vector viral d12.CALP- Δ RR se infectó el cultivo monocapa subconfluente de células MFH-AI-LM (progenies celulares con una alta actividad metastásica en el pulmón a partir de las células MFH-AI del histiocitoma fibroso maligno humano), en una placa de cultivo tisular con 6 pocillos con una multiplicidad infectiva (MOI) de 0,01 (pfu/célula en FBS/PBS al 1%, termoinactivado. Además, con el vector viral d12.CALP- Δ RR se infectó el cultivo monocapa subconfluente de las células GIST humanas y el cultivo de las células del mioma uterino humano en una placa de cultivo tisular con 6 pocillos con una multiplicidad infectiva (MOI) de 0,1 o de 0,01 (pfu/célula), respectivamente. Dichas células infectadas se incubaron a 37°C durante 1 hora, y se cultivaron entonces en el medio (ya mencionado anteriormente) de FBS al 1% y 11,3 μ g/ml de la IgG humana (Jackson ImmunoResearch Lab.). Setenta y dos horas después de la infección, se llevó a cabo la tinción X-Gal, contándose el número de calvas/pocillo.

A-7 (Análisis de la sensibilidad contra el ganciclovir, un agente antiviral del herpes de la replicación vírica *in vitro*)

Con el virus se infectó el cultivo monocapa subconfluente de células SK-LMS-1 en una placa de cultivo tisular con 24 pocillos (5 x 10⁴/pocillo) o una placa de cultivo tisular con 6 pocillos (2,5 x 10⁵/pocillo), con una multiplicidad infectiva (MOI) de 0,01 pfu/célula en FBS/PBS al 1%, termoinactivado. Dichas células infectadas se incubaron a 37°C durante 1 hora, y se cultivaron entonces en el medio de FBS al 1% y con 11,3 μ g/ml de la IgG humana (Jackson ImmunoResearch Lab.) y varias concentraciones (0 a 1 μ g/ml) de ganciclovir (Wako Pure Chemical Industries, Ltd). Tras cuarenta y ocho horas de la infección, se llevó a cabo el conteo del número de calvas/pocillo.

Para el análisis de inmunotransferencia de la expresión de ICP4, el vector viral d12.CALP- Δ RR o el tampón vírico solo se infectó en las células SK-LMS-1 y en las células OST, respectivamente, con una multiplicidad infectiva (MOI) de 0,01 (pfu/célula), aislándose después del cultivo durante 22 horas. La misma cantidad de proteínas se sometió a una electroforesis en gel SDS-PAGE al 9%, y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Se utilizó leche desnatada al 5% (DIFCO Laboratories) para bloquear la membrana a temperatura ambiente durante dos horas,

llevándose a cabo la incubación durante la noche a 4°C utilizando dicho anticuerpo antiICP4 (tasa de dilución 1:10.000).

A-8 (Tratamiento *in vivo* y análisis histológico)

5 Para estudiar el efecto terapéutico de una administración intravenosa del vector viral d12-CALP-ΔRR contra los injertos tumorales humanos trasplantados subdérmicamente, se inyectaron subcutáneamente en el flanco de seis ratones hembras atímicas desnudas de seis semanas de edad (BALB/c Slc-nu/un) (Japan SLC), 1 x 10⁷ células MFH-AI del histiocitoma fibroso maligno humano, fijándose los tumores. Después de 19 días del trasplante a los ratones desnudos, se desarrollaron los tumores desde un diámetro de 6 mm aproximadamente a 7 mm (50 a 70 mm³). Se inyectaron 100 μl de la suspensión vírica que contenía 1 x 10⁷ pfu/ratón del vector viral d12-CALP-ΔRR (n=6), o idéntica cantidad del tampón vírico (n=6), una vez en la vena de la cola, respectivamente, utilizando una aguja de calibre 30 (30 gauge). Se midieron los tumores en un período predeterminado después de la inyección, y se calculó el volumen tumoral según la fórmula [un cuadrado de 0,53 x la longitud x la anchura].

15 Además, para estudiar el efecto terapéutico de la administración intravenosa del vector viral d12-CALP-ΔRR contra el tumor metastásico pulmonar humano, 1 x 10⁶ células de la progenie celular MFH-AI-LM con una alta actividad metastásica pulmonar, aisladas a partir de las células MFH-AI del histiocitoma fibroso maligno humano, se inyectaron una vez en la vena de la cola de seis ratones hembras atímicas desnudas de seis semanas de edad (BALB/c Slc-nu/nu) (Japan SLC), construyéndose un modelo tumoral metastásico pulmonar. Catorce días después de la inyección intravenosa de las células MFH-AI-LM, para estudios histológicos, 100 μl de la suspensión vírica que contenía 1 x 10⁷ pfu/ratón del vector viral d12-CALP-ΔRR, se inyectaron intravenosamente una vez, utilizando una aguja del calibre 30, sacrificándose los animales a los 13 días. Se obtuvieron los tejidos pulmonares metastatizados al completo y el cerebro, hígado, riñón, corazón, intestino delgado, útero y ovarios, para utilizarlos como muestras. Estas muestras se fijaron con paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,5%, en PBS que contenía 1 mM de MgCl₂, durante la noche, a 4°C. Entonces, seguido por la tinción con X-gal, los tumores se situaron en una solución de sustrato, que contenía X-gal (1 mg/ml), 5 mM K₃Fe (CN)₆, 5 mM K₄Fe (CN)₆, y 1 mM MgCl₂ en PBS durante 4 horas a 37°C, lavándolos entonces con PBS que contenía DMSO al 3%. Las muestras de los tejidos metastatizados pulmonares al completo se fijaron en solución de Bouin [solución de ácido pícrico saturada al 15% (vol/vol), formalina al 1,65% (v/v), y ácido acético al 1% (v/v)/PBS], embebiéndose en parafina. Se montaron cortes de 4 μm de grosor sobre un microporta-objetos revestido con poli-L-lisina, se trataron con xileno, y se deshidrataron mediante concentraciones graduadas de una solución alcohólica. Entonces, se llevó a cabo la tinción con hematoxilina-eosina, y se observó, utilizando un microscopio de inversión (Olympus BX-50), la fragmentación de los tejidos tumorales (que se había producido) con el vector viral d12-CALP-ΔRR.

25 A continuación, se construyó un modelo tumoral metastásico pulmonar, inyectando 1 x 10⁶ o 5 x 10⁵ células MFH-AI-LM en la vena de la cola de ratones hembras atímicas desnudas de una edad de seis semanas (BALB/c Slc-nu/nu) (Japan SLC). Diecisiete, 27 y 34 días después de la inyección intravenosa de las células MFH-AI-LM, 50 μl de la suspensión viral, que contenía 1 x 10⁷ pfu/ratón del vector viral d12-CALP-ΔRR, se inyectaron intravenosamente por tres veces utilizando una aguja del calibre 30, sacrificándose los animales después de 13 días. Se obtuvieron los tejidos metastatizados pulmonares al completo, y se fijaron con paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 0,5%, en PBS que contenía 1 mM MgCl, durante la noche, a 4°C. Entonces, se examinó el efecto terapéutico (alcanzado) mediante la administración intravenosa del vector viral d12-CALP-ΔRR contra el tumor metastásico pulmonar humano.

A-9 (Análisis estadístico)

40 Se determinaron diferencias estadísticas utilizando la prueba-t no apareada de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con p < 0,05.

EJEMPLO B [Resultados]

B-1 (Replicación selectiva de un vector HSV recombinante en células positivas a la calponina, *in vitro*).

45 Para construir un vector HSV que replica selectivamente en las células positivas a la calponina y en las células proliferantes, se insertó un fragmento de ADN que contenía el potenciador 4F2/promotor de la calponina - 260/ICP4/IRES-EGFP en el locus RR (ICP6) (U_L36) del mutante d120 de HSV defectuoso en ICP4 (J. Virol. 56, 558-570, 1985), mediante recombinación homóloga, construyéndose un vector viral d12-CALP-ΔRR. El vector viral d12-CALP-ΔRR que expresa la β-galactosidasa bajo el control de un promotor ICP6, y puede expresar la proteína ICP4 y la proteína EGFP bajo el control del promotor de la calponina (figura 1). La progenie celular de liomiosarcoma humano que expresa la calponina (SK-LMS-1) y la progenie celular del osteosarcoma humano, que no expresa la calponina (OST), se utilizaron para evaluar la selectividad celular de la replicación viral del vector viral d12-CALP-ΔRR.

55 Los títulos virales se evaluaron mediante ensayos de crecimiento de etapa única de una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 (pfu/célula) (2 x 10⁵ células/pocillo). El vector viral d12-CALP-ΔRR se replicó en células SK-LMS-1 positivas a la calponina, pero los títulos del vector viral d12-CALP-ΔRR disminuyeron en las células OST negativas a la calponina, a aproximadamente 1/100.000, 72 horas después de la infección, comparados con los de las células SK-LMS-1 (figura 2). La tasa de proliferación de ambas células estuvo al mismo nivel. Llevando a cabo el análisis de inmunotransferencia de los extractos celulares, 22 horas después de la infección, se descubrió que la proteína ICP4 se

expresó en las células SK-LMS-1, pero no en las células OST. Concordaba así con el resultado del ensayo de replicación vírica. Al contrario, el vector viral d120, que es el virus parental de la recombinación homóloga, no mostró, en absoluto, la generación de progenies virales en los cultivos de SK-LMS-1 y OST.

5 Se infectó el vector viral d12•CALP•ΔRR a las células SK-LMS-1 en una placa de 6 pocillos, y a las 96 horas de la infección, las células que expresaban β-galactosidasa se tiñeron de azul con el recubrimiento de X-gal agarosa, examinándose también, al mismo tiempo, la expresión de EGFP con un microscopio de fluorescencia invertido. Se confirmó que la β-galactosidasa se expresó en las células tumorales que estaban fragmentándose y casi habían desaparecido, y que EGFP se expresaba en las células vivientes alrededor de ellas (figura 3). Existió un número de observaciones en las que ambas expresiones tuvieron lugar al mismo tiempo en una célula.

10 B-2 (Sensibilidad al ganciclovir, un agente vírico antiviral del herpes, del vector HSV-1 recombinante).

15 Cuando el vector viral d12•CALP•ΔRR se aplica a terapias para los tumores malignos humanos, la propiedad más importante es que la sensibilidad al ganciclovir, o agente vírico antiviral del herpes, está indicada, ya que posee genes TK en estado intacto. El vector viral d12•CALP•ΔRR infectó a las células SK-LMS-1 en una placa de 24 pocillos (5 x 10⁴/pocillo), en presencia de ganciclovir a varias concentraciones (de 0 a 100 ng/ml), con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 (pfu/célula). Cuarenta y ocho horas después de la infección, las células se tiñeron con X-gal como sustrato, y se contó el número de calvas β-galactosidasa positivas por pocillo. Además, el vector viral d12•CALP•ΔRR infectó a las células Vero E5 (2,5 x 10⁵/pocillo) en una placa con 6 pocillos, en presencia y ausencia de 1 μg/ml de ganciclovir, y 48 horas después de la infección, las células se tiñeron con X-gal como un sustrato (figura 4).

20 La replicación del vector viral d12•CALP•ΔRR fue suprimida en presencia de ganciclovir, para las células SK-LMS-1 y las células Vero E5 en las que se introdujo ICP4 cADN. En las células SK-LMS-1, la replicación se suspendió completamente en presencia de 40 ng/ml de ganciclovir. El vector viral d12•CALP•ΔRR mostró sensibilidad al ganciclovir, que es igual al mutante hrR3 HSV-1 replicador, del que se informa que posee una sensibilidad más intensa a dicho agente medicamentoso que el virus de tipo salvaje (Cancer Res. 54, 3963-3966, 2001). Este resultado indica que el vector viral d12•CALP•ΔRR muestra una medida de seguridad en la que las células víricamente infectadas pueden ser eliminadas mediante el ganciclovir o el aciclovir, después de la terapia.

25 B-3 (Tratamiento *in vivo* y análisis histológico)

El análisis RT-PCR para el ARN total de las progenies celulares MFH-AI-LM se llevó a cabo para examinar si las progenies celulares MFH-AI-LM expresan el ARNm de la calponina (figura 5a). Además, las progenies celulares MFH-AI-LM anteriormente mencionadas se infectaron con el vector viral d12•CALP•ΔRR durante 72 horas con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 (pfu/célula). La replicación del vector se tiñó con X-gal y se evaluó como un índice, con la formación de la calva (figura 5b). Como resultado, se confirmó que el vector viral d12•CALP•ΔRR se replicó dentro de las células MFH-AI-LM, y que muestra actividad citolítica contra las células MFH-AI-LM. Además, el vector viral d12•CALP•ΔRR infectó a células GIST cultivadas y a células de mioma uterino durante 72 horas, respectivamente, con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01 o 0,1 (pfu/célula). La replicación del vector se tiñó con X-gal y se evaluó con la formación de la calva como un índice (figura 6). Como resultado, se confirmó que el vector viral d12•CALP•ΔRR se replicó en el interior de las células GIST cultivadas (figuras 6a, 6b) y de las células del mioma uterino (figuras 6c, 6d), y, a partir de los resultados de 0,01 MOI (figuras 6a, 6c) y 0,1 MOI (figuras 6b, 6d), se confirmó que el vector viral d12•CALP•ΔRR muestra actividad citolítica de una forma que depende de la dosis. En particular, en la administración con 0,1 MOI, (figuras 6b, 6d), se observó la infección del vector viral d12•CALP•ΔRR en todas las células tumorales.

45 Se examinó el efecto antitumoral *in vivo* del vector viral d12•CALP•ΔRR contra los injertos tumorales trasplantados subdérmicamente que se aislaron de las células MFH-AI. El efecto terapéutico mediante una inyección intravenosa del vector viral d12•CALP•ΔRR contra los tumores subdérmicos trasplantados de las progenies celulares MPH-AI-LM, se expresa como un cambio cronológico (figura 7). En el día 0, el vector viral d12•CALP•ΔRR de 1 x 10⁷ pfu/ratón se infectó en la vena de la cola. El volumen tumoral (media ± S.E., n=6), del grupo en el día 29, después de haber sido tratado con la inyección intravenosa (vector viral d12•CALP•ΔRR administrado) y del grupo no tratado (PBS administrado) fueron de 500 ± 136 mm³ y 183 ± 33 mm³, respectivamente. El grupo tratado mostraba un efecto antitumoral significativo comparado con el del grupo no tratado.

50 Se examinó el efecto terapéutico del vector viral d12•CALP•ΔRR contra el tumor metastásico pulmonar humano mediante la inyección intravenosa *in vivo* (figura 8). El vector viral d12•CALP•ΔRR de 1 x 10⁷ pfu/ratón, se inyectó en la vena de la cola de un modelo murino tumoral metastásico pulmonar, en el que se utilizaron las células MFH-AI-LM con una alta actividad metastásica para el pulmón, aisladas a partir de las células MFH-AI del histiocitoma fibroso maligno humano, extrayéndose en el mismo día las metástasis tumorales pulmonares en el día 13 (figuras 8a, 8b) y los tejidos normales, esto es, el cerebro (figura 8c), corazón (figura 8d), hígado (figura 8e), que se sometieron a tinción X-gal. El análisis histológico del tumor metastásico pulmonar mediante tinción de hematoxilina-eosina (figuras 8f, 8g) también se llevó a cabo. Realizando una administración intravenosa del vector viral d12•CALP•ΔRR, se observó una necrosis tumoral en el foco metastásico pulmonar, mediante una tinción X-Gal que indica la replicación del vector viral d12•CALP•ΔRR. Sin embargo, la tinción X-Gal que indica la infección y replicación del vector viral d12•CALP•ΔRR en los tejidos normales, no se observó.

A continuación, se examinó el efecto terapéutico del tumor metastásico pulmonar humano, en el que el número de células MFH-AI-LM que se administraron se fijó en 1×10^6 o 5×10^5 , y en el vector viral d12•CALP• Δ RR de 1×10^7 pfu/ratón, se inyectó intravenosamente por un total de tres veces en el día 17, día 27 y día 34, después de la administración de las células MFH-AI-LM (figura 9). Para todos los modelos tumorales metastásicos construidos inyectando 1×10^6 ó 5×10^5 de células tumorales MFH-AI-LM en la vena de la cola, el efecto supresor tumoral metastásico pulmonar de los grupos a los que se les administró el vector d12•CALP• Δ RR, fue aparente. Además, el efecto supresor de las metástasis del grupo tratado fue también confirmado mediante el análisis histológico con tinción de hematoxilina-eosina.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Un tumor maligno derivado de las células mesenquimáticas, que es un sarcoma, es resistente a la quimioterapia o radioterapia y continúa reproduciéndose incluso después de resección quirúrgica, y si eventualmente metastatiza al pulmón, hígado, peritoneo y similares, el pronóstico es completamente adverso. El número de casos en Japón es de aproximadamente 5.000 al año incluyendo principalmente al tumor estromático gastrointestinal (GIST) en el ámbito de la cirugía intestinal, el sarcoma óseo o de los tejidos blandos en el ámbito de la cirugía ortopédica, el liomiosarcoma en el ámbito de la ginecología, el mesotelioma maligno en el ámbito de la cirugía de la mama y digestiva, el fibrosarcoma, el meningioma maligno, el neurinoma maligno en el ámbito de la neurocirugía, y similares. Aunque sólo representa aproximadamente de 1 a 2% de todos los cánceres, y como se genera frecuentemente también en la gente joven, y no existe una modalidad de tratamiento efectivo, excepto para algunos casos que poseen sensibilidad a la quimioterapia, el desarrollo de una nueva modalidad de tratamiento está intensamente requerido socialmente. Mediante análisis genético asociado a la causa y patología del sarcoma, se ha informado de la mutación de los genes p53 y Rb en osteosarcomas y liomiosarcomas, la mutación del gen KIT en GIST, la presencia de un gen de fusión en el sarcoma de Ewing y el sarcoma sinovial y el liposarcoma. Sin embargo, no han alcanzado la fase de aplicación a las terapias. Además, en los experimentos animales llevados a cabo previamente, han habido intentos para la introducción directa en las células del sarcoma utilizando varios vectores, que incluyen la p53 y la citoquina, y a la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk) que es un gen suicida. Sin embargo, no se ha conseguido un efecto terapéutico suficiente.

La terapia génica puede aumentar la selectividad de la célula cancerosa a varios niveles, tal como la acción selectiva celular de los genes que se introducen en las células cancerosas, la actividad de los promotores de expresión, y la infección/ introducción de vectores virales, enfocándose como un procedimiento terapéutico prometedor, también para el sarcoma. En verdad, se informa de que la expresión osteosarcoma-selectiva de HSV-tk en un vector adenovírico no replicante, utilizando un promotor de la osteocalcina, puede suprimir de modo efectivo el foco metastásico pulmonar también mediante administración intravenosa (Cancer Gen Ther. 5, 274-280, 1998). Sin embargo, ya que la osteocalcina se expresa también en los osteoblastos normales en el estadio de diferenciación, no es suficiente aumentar la selectividad de las células cancerosas regulando sólo la expresión del transgén. Además, el aumento de la selectividad celular por los promotores de los genes marcadores para la diferenciación, disminuye, por otra parte, el propósito general del vector. Para los sarcomas procedentes de diversos tejidos y células, y tienen un número limitado de casos, no resulta ventajoso desde el punto de vista de efectividad-costo del desarrollo vectorial.

Además, es imposible introducir genes terapéuticos en todas las células cancerosas utilizando vectores virales y vectores liposómicos que son defectuosos con respecto a la capacidad replicadora, que se han utilizado hasta ahora en las terapias génicas experimentales contra los sarcomas. Por tanto, aunque a partir de los experimentos animales puede conseguirse la prolongación de la vida, no puede esperarse un efecto antitumoral continuo. Además, si la eficiencia inductora de los genes en las células cancerosas es baja, cuantos más vectores virales sean necesarios, más aumentará el riesgo de inducir una inmunorreacción y una reacción alérgica excesivas.

Para el tratamiento de los sarcomas "no tratables", se cree que es necesario un enfoque completamente nuevo, distinto al de los procedimientos convencionales, pero para el que, sin embargo, no se han obtenido pistas. Los ejemplos de la presente descripción pueden satisfacer dichos requisitos, y la presente descripción puede proporcionar un vector de expresión/replicación específico para células que no actúe sobre las células normales, que se replique en células particulares como en las células tumorales malignas y similares, que no se limiten al sarcoma, y que exprese genes específicamente terapéuticos mientras fragmentan las células tumorales. Utilizando dicho vector de expresión/replicación específico para células, provisto con medidas de seguridad que puedan detener la replicación de los virus con un agente medicamentoso después de la finalización de la terapia, puede ser posible, por primera vez en el mundo una terapia génica que utilice un vector de expresión/replicación específico para células para el hombre.

El gen de la calponina se expresa principalmente en las células musculares lisas en el organismo adulto, y en particular, ya que la proliferación de las células musculares lisas vasculares es la causa de la lesión vascular proliferante tal como la neoangiogénesis tumoral y de la constricción de los vasos sanguíneos después del emplazamiento de la endoprótesis vascular y también, de la retinopatía diabética, posibilita terapias para estas enfermedades mediante la fragmentación selectiva de las células musculares lisas proliferantes, utilizando el vector específico para las células musculares lisas de expresión/replicación, que posee un promotor de la calponina que se proporciona a partir de la presente descripción. Entre estas terapias, el procedimiento terapéutico que fragmenta selectivamente los músculos lisos vasculares tumorales incluidos únicamente a título de ejemplo, que resulta posible por primera vez mediante la presente descripción, tiene la posibilidad de presentar un efecto innovador para todos los cánceres sólidos. Además,

puede actuar efectivamente como un agente terapéutico contra las glomerulonefritis proliferantes, causadas por la proliferación de las células mesangiales que expresan calponina, o contra las fibrosis, tales como la pulmonar y la hepática, que son causadas por la proliferación del miofibroblasto que expresa la calponina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

5 <120> Vector de expresión/replicación específicos de células

<130> B08-01PCT

<140>

10 <141>

<150> JP P2001-402102

<151> 2001-12-28

15 <150> JP P2002-255395

<151> 2002-08-30

<160> 9

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 41

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 1

gaaacaatga cacaatcagc tccaataacc aaggcctga c

41

30

<210> 2

<211> 260

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35

<400> 2

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aagggccitga catcacaagg ggaggggaag 60
 gcagcigagg ttgigggggg agglgccccg cccctlggca ggcccciaca gccaalggaa 120
 cggcccigga agagacccgg glcgcciccg gagctlcaaa aacalglgag gaggggaagag 180
 lglgcagacg gaactlcagc cgctgccict gliclcagcg lcaglgccgc cactgcccc 240
 gccagagccc accggccagc 260

<210> 3

5 <211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Región constituida por el promotor del gen de la calponina humano y su fragmento génico estructural

<400> 3

gaaacaatga cacaatcagc tcccaatacc aagggccitga catcacaagg ggaggggaag 60
 gcagcigagg ttgigggggg agglgccccg cccctlggca ggcccciaca gccaalggaa 120
 cggcccigga agagacccgg glcgcciccg gagctlcaaa aacalglgag gaggggaagag 180
 lglgcagacg gaactlcagc cgctgccict gliclcagcg lcaglgccgc cactgcccc 240
 gccagagccc accggccagc atglccicig ctcaactlcaa ccgaggccct gcctacgggc 300
 15 lglcagccga ggllaagaac aagglagggg lgg 333

<210> 4

<211> 445

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400>

glgaglgcag cgcgccccg tcccgggtac ctccggltga atcgggtggc ttgcaccgac 60
 cccctcccci gtccccagac ggalctagal ggltcttccc tccatcccci accgacgaci 120
 glccccctt cccccacccc ctccccggca caatglcctt ccttcttctc ttgaagaaa 180
 gccgacccgc ccttcactcc gtcacgaggg lgggtgactc agcgtcttcc ttccccgcgg 240

cgccagaagc cagllgcaac cgglllciga aglaalgigc aggaticciti acalcagcic 300
 cicigagtci cglgailcag ccllgccicc ciclcicccc clllgccccc iccccgiccc 360
 acccllaggc gcigggagaa gggagggigg ggaggicagg ggccicicag aggggcccica 420
 cllgllaacc cagcccccal ticag 445

<210> 5

<211> 455

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

ggatcccaig lcccalcaga gclaaaagcc ccaggaggag agggiggctg glllgicccc 60
 acaaacccci gggatcccg gclcccccagc cccllgcccc iclcicccagc cagactictal 120
 lgaaciccgc cllcliccaa actcggggcc agagaacagi gaagtaggag cagccglaag 180
 lccgggcagg gllciglicca faaaaggciti llcccgggcc ggclcccccgc cggcagcgtg 240
 ccccgccccg gcccgclicca lciccaaagc atgcagagaa lgiclcggca gccccggtag 300
 acigclicca cllggigtci llccccaaat atggagcctg lgiggagica clgggggagc 360
 cgggggiggg gagcggagcc ggcllccici agcagggagg gggccgagga gcgagccagi 420
 gggggaggci gacalcacca cggcggcagc cciti 455

10

<210> 6

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: FP1

20 <400> 6

gagtgtgcag acggaacttc agcc

24

<210> 7

25 <211> 21

<212> ADN

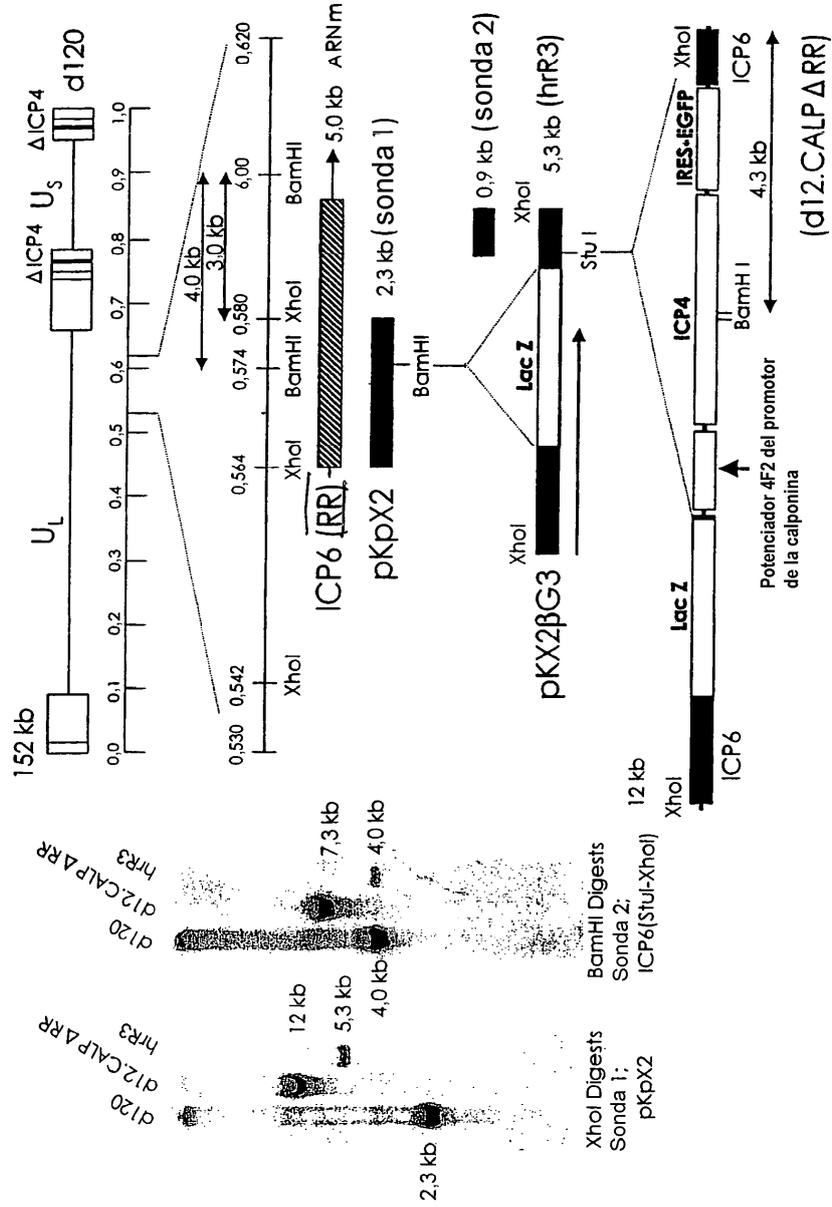
<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: RP1	
	<400> 7	
5	gtctgtgcc aactggggt c	21
	<210> 8	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: FP2	
15	<400> 8	
	cccatcacca tcttcagga	20
20	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: RP2	
	<400> 9	
30	ttgtcatacc aggaaatgag c	21

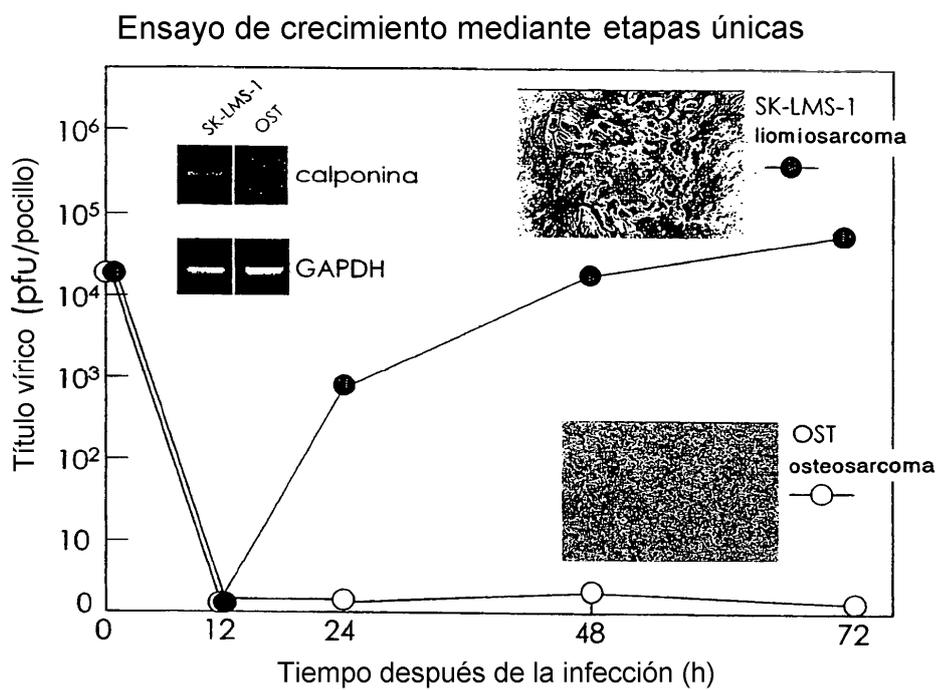
REIVINDICACIONES

1. Vector del virus del herpes simple (HSV) que induce la expresión génica viral y la replicación viral específicamente en una célula que expresa calponina y que prolifera, que no se replica en las células normales adultas, y que puede suprimir su replicación en un momento deseado utilizando el gen de la timidina cinasa,
- 5 en el que el vector comprende un fragmento de ADN que comprende:
- (i) una región promotora del gen humano de la calponina, que comprende la secuencia nucleótida representada por SEC. ID. nº 3;
 - (ii) el gen ICP4 que codifica un factor de transcripción esencial para la iniciación de una replicación del virus del herpes, que se integra corriente abajo de la región promotora del gen humano de la calponina;
- 10 (iii) el gen EGFP (proteína verde fluorescente potenciada) unido corriente abajo del gen ICP4 mediante un sitio de entrada ribosómico interno; y
- (iv) el gen LacZ que se integra corriente arriba de dicha región promotora del gen humano de la calponina,
- y en el que este fragmento de ADN se inserta mediante recombinación en el locus del gen de la ribonucleótido reductasa de un vector HSV que comprende un gen de timidina cinasa endógeno y que carece de la función del gen ICP4 endógeno,
- 15 y en el que la expresión de tanto el gen LacZ como del gen EGFP integrados en el vector, es utilizada como marcadores para identificar el vector HSV recombinante.
2. Vector HSV según la reivindicación 1, en el que un potenciador se integra corriente arriba de la región promotora del gen humano de la calponina.
- 20 3. Vector HSV según la reivindicación 2, en el que el potenciador es un potenciador 4F2.
4. Medicamento terapéutico que comprende el vector HSV según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Procedimiento para producir un vector HSV, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, induciendo dicho vector una expresión génica viral y una replicación viral específicamente en una célula que expresa calponina y que prolifera, que no se replica en las células normales adultas, y que puede suprimir su replicación en un momento deseado utilizando el gen de la timidina cinasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
- 25 (a) preparar un fragmento de ADN que comprende:
- (i) una región promotora del gen humano de la calponina, que comprende la secuencia nucleótida representada por SEC. ID. nº 3;
 - (ii) el gen ICP4 que codifica un factor de transcripción esencial para la iniciación de una replicación del virus del herpes, que se integra corriente abajo de la región promotora del gen humano de la calponina;
- 30 (iii) el gen EGFP unido corriente abajo del gen ICP4 mediante un sitio de entrada ribosómico interno, y
- (iv) el gen LacZ integrado corriente arriba de la región promotora del gen humano de la calponina,
- (b) preparar recombinantes, mediante cotransfección con el vector HSV, que comprende un gen endógeno de la timidina cinasa y que carece de la función del gen endógeno ICP4, junto con el fragmento de ADN en una célula, en la que una región promotora del gen humano de la calponina que comprende la secuencia nucleótida representada por SEC. ID. nº 3, puede activarse, o una célula que exprese el gen humano de la calponina; y
- 35 (c) con el fin de cribar un vector HSV recombinante, en el que el fragmento de ADN se inserta mediante una recombinación homóloga en el locus del gen de la ribonucleótido reductasa del vector HSV que comprende un gen endógeno de la timidina cinasa y que carece de la función del gen endógeno ICP4 de entre los recombinantes, seleccionar un clon único del vector HSV de entre los recombinantes mediante dilución limitante, sin utilizar el ensayo de recubrimiento de agarosa utilizando las expresiones tanto del gen LacZ como del gen EGFP, como marcadores.
- 40

[Fig. 1]

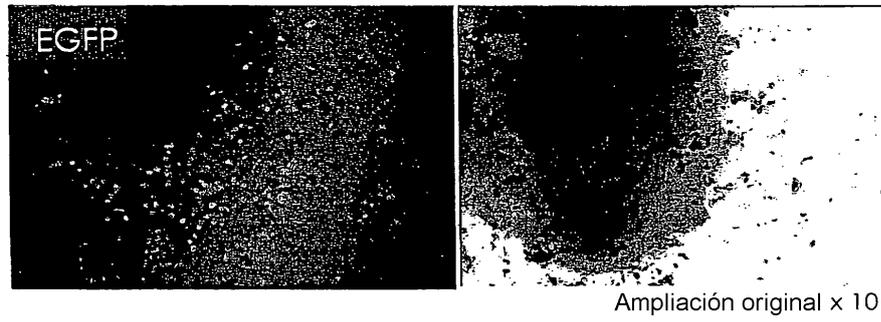
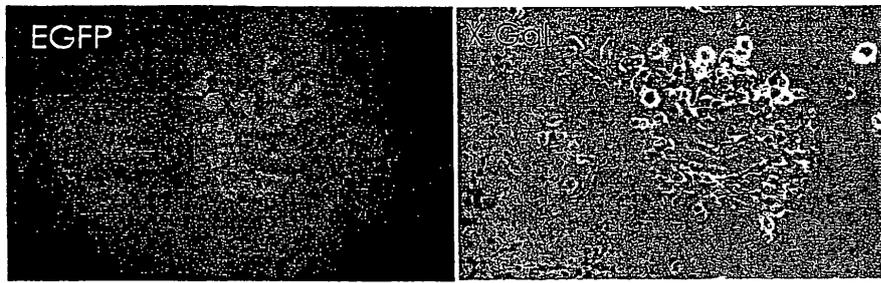


[Fig. 2]

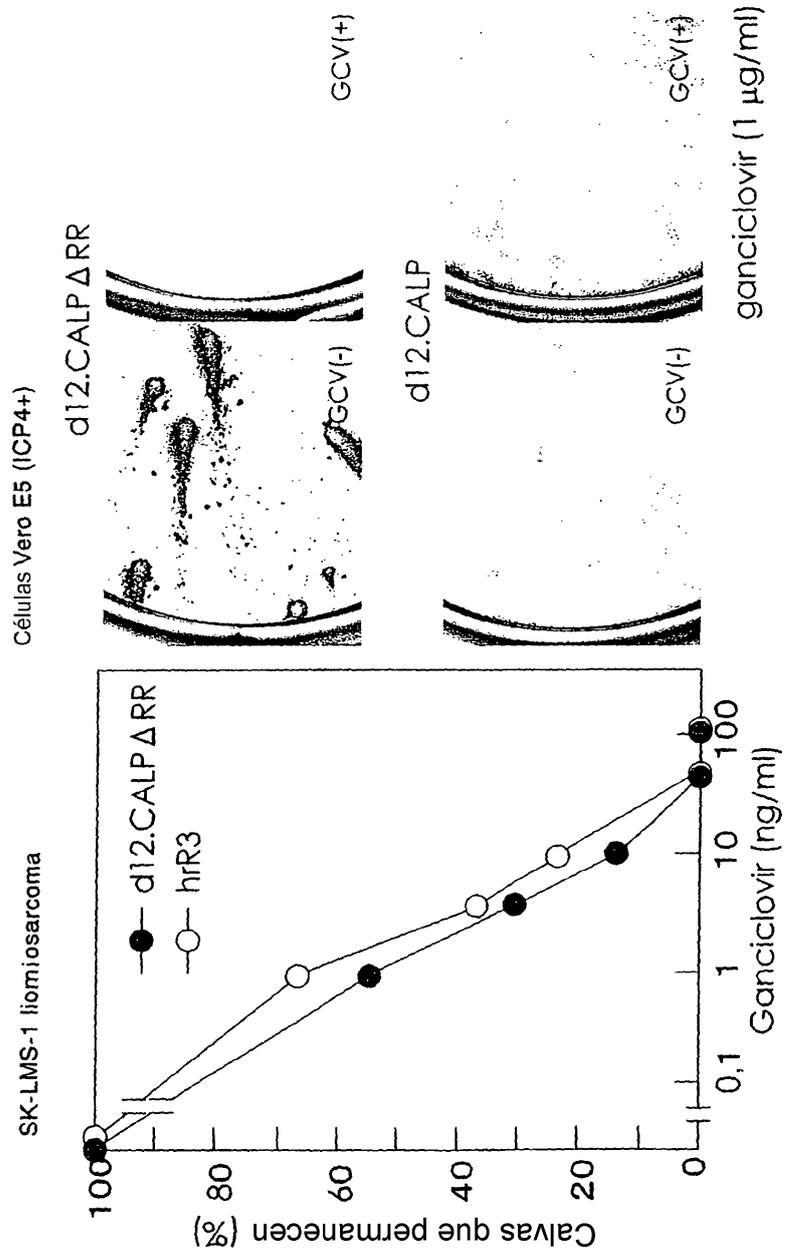


[Fig. 3]

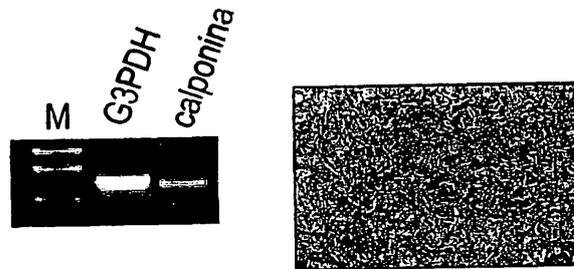
SK-LMS-1 liomiosarcoma



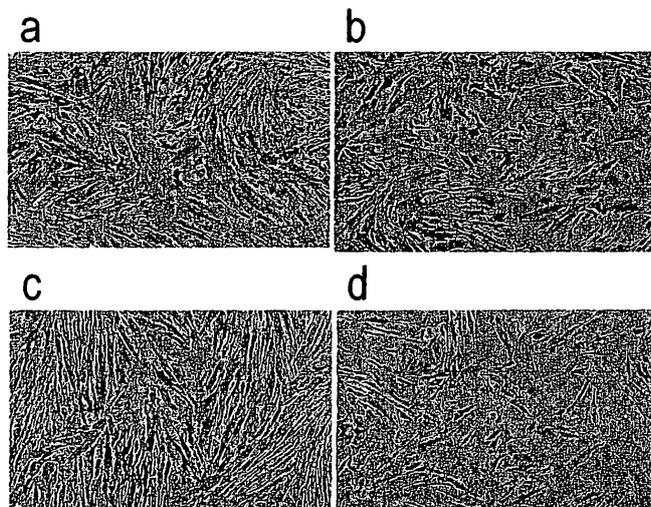
[Fig. 4]



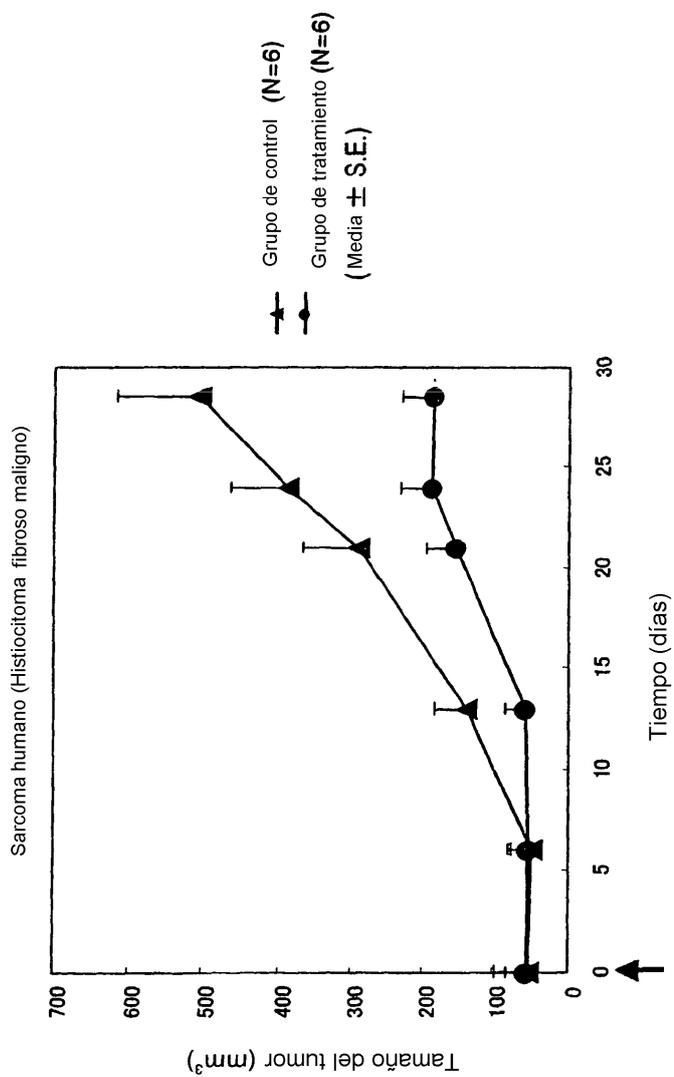
[Fig. 5]



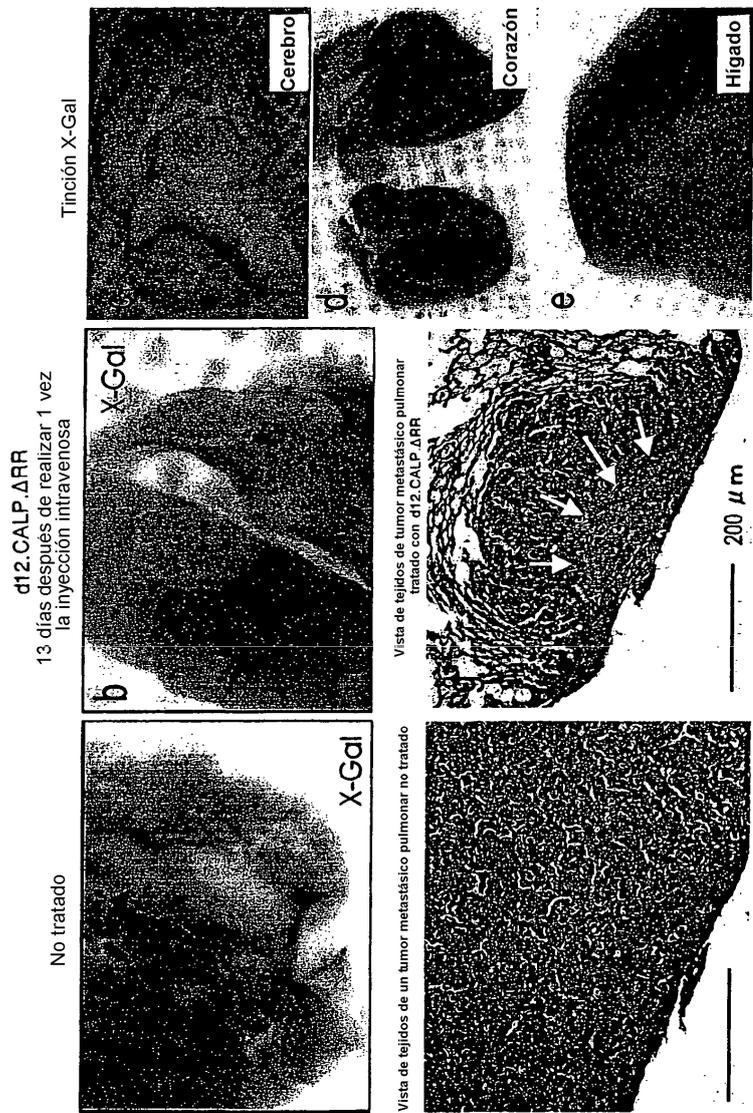
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

