



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 617**

51 Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04760083 .8**
96 Fecha de presentación : **21.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1619951**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de trastornos.**

30 Prioridad: **21.04.2003 US 464571 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.10.2011

73 Titular/es:
EPEIUS BIOTECHNOLOGIES CORPORATION
475 Huntingdon Drive
San Marino, California 91108, US

72 Inventor/es: **Gordon, Erlinda M. y**
Hall, Frederick L.

74 Agente: **Arpe Fernández, Manuel**

ES 2 366 617 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para tratamiento de trastornos

Campo Técnico

5 **[0001]** La presente invención se refiere en términos generales a unos métodos de fabricación de vectores terapéuticamente efectivos.

Antecedentes

10 **[0002]** Aproximadamente un 7% de todos los protocolos de terapia genética están enfocados al tratamiento del cáncer metastático. La mayor parte de los protocolos activos se refieren a algún tipo de inmunoterapia contra el cáncer mediante transferencia genética basada en células de citoquinas de antígenos tumorales, mientras otros conllevan el aporte intratumoral de virus oncolíticos o vectores de transporte de promedicamentos, agentes quimioprotectores, constructos antisentido, o genes supresores de tumores. No obstante, el principal problema que queda por resolver y que ha obstaculizado el desarrollo y el despliegue de una terapia genética anticáncer efectiva es la del ineficiente aporte in vivo a las células de destino, un problema que obstaculiza e impide multitud de enfoques terapéuticos directos (Tseng y Mulligan, Surg. Oncol. Clin. N. Am. 11:537-569, 2002). A este respecto, la aparición de las dianas patotrópicas ha supuesto un nuevo paradigma en la terapia genética anticáncer. Al abordar la histopatología de la lesión - en lugar de las células cancerosas per se - para optimizar la concentración efectiva del vector en los puntos metastáticos, aumentó enormemente la seguridad y la eficacia del vector de la terapia genética de circulación en los estudios preclínicos (Gordon y otros, Cancer Res. 60:3343-3347, 2000; Gordon y otros, Hum. Gene Ther. 12:193-204, 2001). Los resultados preclínicos y clínicos del vector patotrópico, que se ven mejorados aún más por las propiedades inherentes del vector vírico de la leucemia murina (cuya selectividad transluce la división celular) y la especificidad estratégica de un gen de control del ciclo celular que presenta actividad tumoricida y antiangiogénica (Gordon y otros, Hum. Gene Ther. 12:193-204, 2001), crea la posibilidad del aporte sistémico de medicamentos genéticos para el control fisiológico y el tratamiento de los cánceres primarios, remotos, metastáticos y ocultos.

25 **[0003]** En Lenz y otros, Human Gene Therapy 13: 1515-1537 (10 de agosto de 2002) se proporciona un protocolo clínico para la evaluación específica del emplazamiento tumoral de Fase I de la seguridad y la eficacia de la infusión arterial hepática de un vector retroviral dirigido a la matriz y que porte un constructo de ciclina dominante negativo G1 como intervención para el tratamiento de la metástasis hepática del carcinoma colorectal.

30 **[0004]** Resulta deseable disponer de vectores mejorados, de sistemas de producción de los vectores mejorados y de regímenes de tratamiento para la administración de dichos vectores, de forma que puedan utilizarse los sistemas de administración dirigidos dentro de un entorno clínico.

Sumario

35 **[0005]** La presente invención se refiere a un método para la elaboración de partículas de vector retrovirales "dirigidas".

[0006] En relación con el método de la presente invención, se presentan nuevos sistemas de expresión retroviral, para la generación de las partículas víricas dirigidas, la utilización de las células productoras humanas transfectadas transitoriamente para la producción de las partículas, un proceso de fabricación para la producción a gran escala de las partículas virales y métodos para la recogida y el almacenamiento de vectores virales dirigidos.

40 **[0007]** En una realización se proporciona un método para producir un vector de administración dirigido. El método incluye las siguientes etapas:

A) transfección transitoria de una célula productora con:

45 i) un primer plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína anfotrópica de envoltura 4070A modificada para contener un dominio de enlace de colágeno, en el que la secuencia de ácido nucleico está enlazada operativamente a un promotor, y en el que el dominio de enlace de colágeno comprende la secuencia de aminoácido Gly-His-Val-Gly-Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Ser-Ala-Ala obtenida a partir del dominio D2 del factor de von Willebrand;

ii) un segundo plásmido, que comprende:

(a) una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido retroviral gag-pol,

50 (b) una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido que confiere a la célula productora resistencia a medicamentos,

(c) un origen de SV40 de replicación,

iii) un tercer plásmido, que comprende:

(a) una secuencia heteróloga de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido de diagnóstico o terapéutico,

(b) secuencias de repetición terminal larga 5' y 3' (LTRs),

5 (c) una secuencia de empaquetado retroviral ψ ,

(d) un promotor CMV antepuesto a la LTR 5',

(e) una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido que confiere a la célula productora resistencia a medicamentos,

10 (f) un origen de SV40 de replicación, en el que la célula productora es una célula humana que expresa un antígeno grande T de SV40;

B) cultivar las células productoras de A) en unas condiciones que permitan la producción de vectores de administración dirigida y su liberación en los sobrenadantes del cultivo;

15 C) Aislar e introducir los sobrenadantes en un sistema de colector de bucle cerrado que comprende una bolsa tipo Flexboy® y un sistema de colector, en el que la bolsa tipo flexboy está formada por una película coextrusionada de tres capas que consta de una capa de contacto con el fluido fabricada con etil vinil acetato, una barrera al gas de etilen vinil alcohol y una capa exterior de etil vinil acetato para la recolección de las partículas virales;

(D) recoger y concentrar los vectores de administración dirigidos, y

(E) tratamiento de dichos vectores de administración dirigidos con un agente de degradación del ADN que no provoque una pérdida de la potencia del vector.

20 En uno de los aspectos, la célula productora es una célula 293T.

[0008] Como se ha mencionado anteriormente, el método también incluye el cultivar las células productoras transfectadas en unas condiciones que permitan la producción del vector de administración dirigida en los sobrenadantes del cultivo y el aislamiento y la introducción del sobrenadante en un sistema de colector de bucle cerrado para la recolección del vector. En las figuras 19A y 19B se presenta un ejemplo de sistema colector de bucle cerrado. El vector de administración dirigida es una partícula retroviral.

25 [0009] En un aspecto, el primer plásmido es el plásmido Bvl/pCAEP el segundo plásmido es el plásmido pCgpn, y el tercer plásmido es el plásmido pdnGl/C-REX o el plásmido pdnGl/C-REX II.

30 [0010] Las partículas recolectadas suelen presentar una titulación viral de entre 1×10^7 y 1×10^{10} unidades de formación de colonias por mililitro. Por otra parte, las partículas víricas suelen tener un diámetro de entre 50 nm y 150 nm.

[0011] El dominio de enlace del colágeno incluye un péptido obtenido a partir del dominio D2 del factor de von Willebrand. Por lo general, el factor de von Willebrand se obtiene a partir de un mamífero. El péptido incluye la secuencia de aminoácido Gly-His-Val-Gly-Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe Met-Ala-Leu-Ser-Ala-Ala. En una realización preferida, el péptido está contenido en la porción gp70 de la proteína proteína anfotrópica de envoltura 4070A.

35 [0012] En una realización, el polipéptido de uso terapéutico es un mutante de supresión del terminal N de la ciclina G1, la interleucina-2 (IL-2), y el factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF) o la timidina quinasa.

40 [0013] Los vectores de administración dirigida descritos en el presente documento suelen contener secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de diagnóstico o terapéuticos. Como se describe en mayor detalle en otros pasajes de esta especificación, los ejemplos de proteínas terapéuticas y polipéptidos no se limitan a las clases de proteínas suicidas, proteínas inductoras de la apoptosis, citoquinas, interleucinas y proteínas de la familia TNF. Los ejemplos de proteínas de diagnóstico o péptidos incluyen, por ejemplo, la proteína verde fluorescente y la luciferasa.

45 [0014] El vector de administración dirigida así obtenido resulta útil para un método de tratamiento de un paciente que sufra un trastorno neoplásico. El método incluye un protocolo de primera fase que comprende el poner en contacto a un paciente con una partícula viral descrita en el presente documento, en el que el paciente se pone en contacto con i) un nivel de dosificación de una primera partícula viral de aproximadamente entre 1×10^9 y 6×10^9 unidades/día que se administra al paciente durante 1 a 6 días sucesivos; ii) un nivel de dosificación de una primera partícula viral de aproximadamente entre 7×10^9 y 1×10^{10} unidades/día que se administra al paciente durante 1 a 3 días sucesivos, con posterioridad a la administración de la primera dosis del vector; y iii) un nivel de dosificación de una partícula viral de aproximadamente entre 1×10^{10} y 5×10^{10} unidades/día que se administra al paciente durante 50 1 a 3 días sucesivos, con posterioridad a la administración de la segunda dosis del vector. El método también

incluye un protocolo de segunda fase que comprende poner a un paciente en contacto con una partícula viral producida en la forma anteriormente indicada, en el que el paciente se pone en contacto con un nivel de dosificación de la partícula viral de aproximadamente entre 1×10^9 y 5×10^9 unidades/día que se administra al paciente durante 1 a 15 días sucesivos, con posterioridad al protocolo de la primera fase. El método incluye opcionalmente la administración de un agente quimioterapéutico al paciente con anterioridad, simultáneamente o con posterioridad a los protocolos de la fase uno y la fase dos. El nivel de dosificación de la primera partícula viral puede estar situado en torno a 4×10^9 y 5×10^9 unidades/día. El nivel de dosificación de la segunda partícula viral puede estar situado en torno a 9×10^9 y 1×10^9 unidades/día. El nivel de dosificación de la tercera partícula viral puede estar situado en torno a 1×10^{10} y 2×10^{10} unidades/día. Por lo general, las partículas virales se acumulan en el paciente en las áreas de colágeno expuesto. Dichas áreas de colágeno expuesto incluyen lesiones neoplásicas, áreas de angiogénesis activa, lesiones neoplásicas, zonas de lesiones vasculares, áreas quirúrgicas, áreas de inflamación y áreas de destrucción de tejidos.

[0015] Los vectores de administración dirigida que se describen en el presente documento pueden administrarse por vía tópica, intravenosa, intra-arterial, intracolón, intratraqueal, intraperitoneal, intranasal, intravascular, intratecal, intramedular, intrapleural, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraocular, intraósea y/o intrasinovial.

[0016] En el presente documento se describe un plásmido que incluye un punto de clonación múltiple enlazado funcionalmente a un promotor, en el que el promotor soporta la expresión de una secuencia heteróloga de ácido nucleico; secuencias de repetición terminal larga 5' y 3'; una secuencia de empaquetado retroviral ψ , un promotor CMV antepuesto a la LTR 5', una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, codificando dicha secuencia un polipéptido que confiere resistencia a medicamentos a la célula productora que contiene el plásmido; y un origen de SV40 de replicación. Entre los ejemplos de plásmidos pueden incluirse el pC-REX II o el pC-REX. Entre los derivados adicionales del ejemplo se incluyen aquellos que contienen una secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico o de diagnóstico.

[0017] Se proporciona un kit para producir vectores de administración dirigida. Por lo general, el kit incluye contenedores que contienen los plásmidos descritos en el presente documento para la producción de, por ejemplo, una partícula viral. Dichos kits pueden incluir adicionalmente una célula productora adecuada para la transfección con los plásmidos, e instrucciones para la transfección transitoria de la célula productora con los plásmidos. Las instrucciones también pueden incluir métodos de cultivo de la célula productora transfectada en unas condiciones que permitan la producción de vectores de administración dirigida. Por ejemplo, un kit para la producción de partículas virales dirigidas puede incluir contenedores que incluyan el plásmido Bvl/pCAEP, el plásmido pCgpn, y el plásmido pdnGI/C-REX o el plásmido pdnGI/C-REX II. Dicho kit puede incluir adicionalmente células 293T e instrucciones para la transfección transitoria de células con los plásmidos, y el cultivo de la célula transfectada en unas condiciones que permitan la producción de partículas virales dirigidas.

[0018] Se proporciona un kit para el tratamiento de los trastornos neoplásicos. El kit comprende un contenedor que incluye una partícula viral producida mediante uno de los métodos descritos en el presente documento, en un excipiente farmacológicamente aceptable, e instrucciones para la administración de la partícula viral a un paciente. La administración puede efectuarse de acuerdo con el ejemplo de protocolo de tratamiento que se proporciona en la tabla 1.

[0019] Se proporciona un método para la realización de una actividad comercial de terapia génica. El método incluye la generación de vectores de administración dirigida y el establecimiento de un banco de vectores, recolectando y suspendiendo las partículas del vector en una solución que contenga un medio adecuado, y almacenando la suspensión. El método también incluye el suministro de las partículas e instrucciones para el uso de las partículas, a un médico o profesional sanitario para su administración a un sujeto (paciente) que la precise. Dichas instrucciones de utilización del vector pueden incluir el ejemplo de régimen de tratamiento que se proporciona en la tabla 1. El método incluye adicionalmente la facturación al paciente o a la compañía aseguradora del paciente.

[0020] Se proporciona un método para la realización de una actividad comercial de terapia génica, que incluye el suministro de los kits descritos en el presente documento a un médico o profesional sanitario.

[0021] La figura 1A muestra un ejemplo representativo de una resonancia magnética procedente del paciente N° 1 un día después de haber finalizado el ciclo N° 1 del tratamiento, en la que se muestra un gran tumor recurrente (T; área rodeada por un corchete) en la región pancreática, dentro de la zona correspondiente al lecho quirúrgico, y un ganglio linfático para-aórtico hipertrofiado (N), que indica la presencia de metástasis.

[0022] La figura 1B muestra una resonancia de seguimiento del paciente N° 1 a los cuatro días de la finalización del ciclo de tratamiento N° 2, que muestra una irregularidad en la forma del tumor recurrente (T; área rodeada por un corchete) con una gran zona de necrosis central (nec) que afecta a un 40-50% de la masa tumoral, y una importante disminución en el tamaño de la metástasis del ganglio linfático para-aórtico (N).

- [0023]** La figura 1C es un gráfico que muestra que la Regin-G induce una reducción en el nivel de CA19-9 en suero en el paciente N° 1. Los niveles de CA19-9 en suero (U/ml), mostrados en el eje vertical, se expresan en función del tiempo (fecha), que se muestra en el eje horizontal. El inicio de cada ciclo de tratamiento se indica mediante flechas.
- 5 **[0024]** La figura 2A muestra un TAC abdominal representativo procedente del paciente N° 2, obtenido al comienzo del ciclo de tratamiento N° 1, que muestra una masa de 6,0 cm³ en la región de la cabeza del páncreas (T) que invade la vena mesentérica superior (SMV) y la arteria mesentérica superior (SMA).
- 10 **[0025]** La figura 2B muestra un TAC abdominal de seguimiento del paciente N° 2, obtenido a los dos días de la finalización del ciclo de tratamiento N° 2, que revela que la masa tumoral pancreática (T) ha reducido su tamaño y ha retrocedido alejándose de los vasos mesentéricos superiores (SMV y SMA). El inicio de cada ciclo de tratamiento se indica mediante flechas.
- 15 **[0026]** La figura 2C es un gráfico que muestra que la Regin-G detiene el crecimiento del tumor primario en el paciente N° 2. Se observó una reducción gradual del tamaño del tumor con tratamientos sucesivos con Regin-G. El volumen del tumor (cm³) obtenido utilizando la fórmula anchura² x longitud x 0,52 (O'Reilly y otros Cell 88, 277, 1997) y que se muestra en el eje vertical, expresándose en función del tiempo, que se muestra en el eje horizontal. El inicio de cada ciclo de tratamiento se indica mediante flechas.
- 20 **[0027]** La figura 3A muestra unos datos que indican que la Regin-C más gemcitabine induce una regresión tumoral en el paciente N° 3, que padecía un cáncer de páncreas con metástasis. El volumen del tumor (cm³) del tumor primario se muestra en el eje Y, expresándose en función del tiempo (fecha). El inicio de las infusiones de Regin-C se indica mediante flechas.
- 25 **[0028]** La figura 3B muestra unos datos que indican que la Regin-C más gemcitabine induce una regresión tumoral en el paciente N° 3, que padecía un cáncer de páncreas con metástasis. El volumen del tumor del ganglio portal se muestra en el eje Y, expresándose en función del tiempo (fecha). El inicio de las infusiones de Regin-C se indica mediante flechas.
- 30 **[0029]** La figura 3C muestra unos datos que indican que la Regin-C más gemcitabine induce una regresión tumoral en el paciente N° 3, que padecía un cáncer de páncreas con metástasis. El número de nódulos hepáticos se muestra en el eje Y, expresándose en función del tiempo (fecha). El inicio de las infusiones de Regin-C se indica mediante flechas.
- 35 **[0030]** En la figura 4A, la presión sanguínea sistólica, expresada en mm de HG se muestra en el eje vertical, mientras que el tiempo de la infusión de la REXIN-G se muestra en el eje horizontal para el paciente N° 1.
- [0031]** En la figura 4B, las pulsaciones por minuto se muestran en el eje vertical, mientras que el tiempo de la infusión de la REXIN-G se muestra en el eje horizontal para el paciente N° 1.
- [0032]** En la figura 4C, la frecuencia respiratoria por minuto se muestra en el eje vertical, mientras que el tiempo de la infusión de la REXIN-G se muestra en el eje horizontal para el paciente N° 1.
- [0033]** En la figura 5A, se muestran datos relativos a la hemoglobina (gms%), al recuento de glóbulos blancos y al recuento de plaquetas correspondiente al paciente N° 1 en el eje Y, expresándose en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X.
- 40 **[0034]** La figura 5B muestra datos que indican que la Regin-G no presenta efectos adversos sobre la función hepática del paciente N° 1. Los valores de AST (U/L) ALT (U/L), y bilirrubina (mg %), que se muestran en el eje Y, se expresan en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X.
- 45 **[0035]** La figura 5C muestra, en relación con el paciente N° 1, los niveles de nitrógeno ureico en sangre (mg %), creatinina (mg %) y potasio (mmol/L) que se muestran en el eje Y, expresándose en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X. El nivel de la dosis I ($4,5 \times 10^9$ cfu/dosis) se administró durante 6 días consecutivos, se dejó un descanso de dos días y se siguió con una dosis de nivel II (9×10^9 cfu/dosis) durante 2 días, y posteriormente, una dosis de nivel III ($1,4 \times 10^{10}$ cfu/dosis) durante 2 días.
- 50 **[0036]** La figura 6 muestra datos que indican que el aumento de la dosis de Regin-G no presenta efectos adversos en las funciones hemodinámicas del paciente N° 2. Para cada nivel de dosis, se muestran la presión sanguínea sistólica (mm HG), las pulsaciones por minuto y la frecuencia respiratoria por minuto en el eje vertical, en función del tiempo de infusión, que se muestra en el eje horizontal.
- [0037]** La figura 7A muestra los niveles de hemoglobina (gms%), y el recuento de glóbulos blancos y plaquetas correspondiente al paciente N° 2, mostrándose en el eje Y, y expresándose en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X.
- [0038]** La figura 7B muestra datos que indican que la Regin-G no presenta efectos adversos sobre la función hepática del paciente N° 2. Los valores de AST (U/L) ALT (U/L), y bilirrubina (mg %), que se muestran en el eje Y, se expresan en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X.

- 5 **[0039]** La figura 7C muestra, en relación con el paciente N° 2, los niveles de nitrógeno ureico en sangre (mg %), creatinina (mg %) y potasio (mmol/L) que se muestran en el eje Y, expresándose en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X. El la dosis de nivel I ($4,5 \times 10^9$ cfu/dosis) se administró durante 5 días consecutivos y se siguió con una dosis de nivel II (9×10^9 cfu/dosis) durante 3 días, y posteriormente, una dosis de nivel III ($1,4 \times 10^{10}$ cfu/dosis) durante 2 días.
- [0040]** La figura 8A muestra los niveles de hemoglobina (gms%), y el recuento de glóbulos blancos y plaquetas correspondiente al paciente N° 3, mostrándose en el eje Y, y expresándose en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X.
- 10 **[0041]** La figura 8B muestra datos que indican que la Rexin-G no presenta efectos adversos sobre la función hepática del paciente N° 3. Los valores de AST (U/L) ALT (U/L), y bilirrubina (mg %), que se muestran en el eje Y, se expresan en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X.
- [0042]** La figura 8C muestra, que la Rexin-G no presenta efectos adversos sobre la función renal del paciente N° 3. Los niveles de nitrógeno ureico en sangre (mg %), creatinina (mg %) y potasio (mmol/L) se muestran en el eje Y, expresándose en función de los días de tratamiento, que se muestran en el eje X. La dosis de nivel I ($4,5 \times 10^9$ cfu/dosis) se administró durante 6 días.
- 15 **[0043]** La figura 9 muestra las medidas de las dimensiones de las nanopartículas de Rexin-G. Utilizando un instrumento detector de precisión (Franklin, MA 02038 U.S.A.), se analizaron las muestras del vector utilizando el método de la dispersión de luz dinámica (DLS) en Modo de tratamiento por lotes, a fin de determinar el tamaño molecular como el radio hidrodinámico (rh). Se utilizó el software Precision Deconvolve para determinar matemáticamente las diversas poblaciones dimensionales a partir de los datos DLS. El promedio de tamaño de partícula de 3 lotes clínicos de Rexin-G es de 95,105 y 95 nm, respectivamente, sin agregación viral detectable.
- 20 **[0044]** La figura 10 muestra la versión HIT (Titulación Altamente Infecciosa) del vector de expresión GTI GlnXSvNa. El plásmido pRV109 aporta el promotor CMV más potente. El vector de expresión pREX resultante tiene un origen de SV40 de replicación episomal y el rescate del plásmido en líneas celulares productoras que expresan el antígeno grande T de SV40 (293T), un gen que presenta resistencia a la ampicilina para su selección y mantenimiento en E. coli, y un gen que presenta resistencia a la neomicina determinado por el e.p. SV40 para determinar la titulación del vector. El gen que nos interesa se clona inicialmente como un producto PCR con salientes Not I y Sal I. Los fragmentos amplificados son verificados mediante el análisis de la secuencia de ADN y se insertan en el vector de expresión retroviral pREX clonando el fragmento respectivo en pGIXsvNa (Gene Therapy Inc.), y extirpando posteriormente el fragmento Kpn I de este plásmido, a lo que sigue el ligado con un plásmido linealizado (digerido por Kpn I) pRV109 para obtener el respectivo vector HIT/pREX.
- 25 **[0045]** La figura 11A muestra un mapa de restricción del plásmido pC-REX. El plásmido se obtiene a partir del GIXSvNa (Genetic Therapy, Inc.), en el que se clonó el CMV, es decir, el estimulante del promotor se clonó en el punto exclusivo Sac II antepuesto a 5' LTR. Puede incluirse una secuencia heteróloga de ácido nucleico (HS) que codifica un polipéptido de diagnóstico o terapéutico entre los puntos de restricción Not 1 y Sal 1. El Gen neo está inducido por el e.p. SV40 con su origen anidado. El plásmido pC-REX resultante se diseñó para la producción de vectores de alta titulación en células 293T.
- 30 **[0046]** La figura 11B muestra un mapa de restricción del plásmido pdnGI/C-REX. El plásmido es idéntico al plásmido pC-REX mostrado en la figura 11A, salvo por que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la mutación negativa 209 aa (630 bp) dnGI (472-1098 nt; 41-249 aa; muestreo N° U47413) preparada por PCR para incluir los salientes Not 1 y Sal 1.
- 35 **[0047]** La figura 11 C muestra una digestión de restricción de pdnGI/C-REX.
- [0048]** La figura 12A muestra un mapa de restricción del plásmido Bvl/pCAEP. El CAEP (P=Pst 1) se creó añadiendo un único punto Pst 1 cerca del extremo N de la proteína de envoltura anfotrópica CAE (4070A), entre aa 6 y 7 del polipéptido maduro gp70. El Bvl es un decapeptido de enlace de colágeno obtenido a partir del vWF, flanqueado por ligantes estratégicos, y se inserta como secuencias de codificación en trama en el punto Pst 1 del PCAEP.
- 40 **[0049]** La figura 12B muestra una digestión de restricción de Bvl/pCAEP.
- [0050]** La figura 13A muestra un mapa de restricción del plásmido pCgpn. Este plásmido codifica el gen MoMuLv gag-pol impulsado por el potenciador del promotor inmediato de la CMV. La secuencia de codificación gag-pol flanqueada por los puntos de clonación EcoR 1 se obtuvo a partir del clon 3PO como pGag-pol-gpt (Moarkowitz y otros, 1988). El esqueleto del vector es pcDNA3.1+ (Invitrogen). Las secuencias de la señal y la transcripción de la Poliadenilación procedentes de la hormona de crecimiento bovina mejoran la estabilidad del ARN. Se presenta un ori SV40 junto con el e. p. correspondiente a la replicación episomal en líneas celulares que expresan el antígeno grande T de SV40.
- 45 **[0051]** La figura 13B describe un digesto de restricción del pCgpn.
- 50
- 55

[0052] La figura 14 muestra un mapa del nuevo plásmido pC-REX II (es decir, EPEIUS-REX).

[0053] La figura 15 muestra un mapa del nuevo plásmido pC-REX II (es decir, EPEIUS-REX) en el que se ha insertado el gen IL-2 de la citoquina terapéutica.

5 **[0054]** La figura 16 muestra un mapa del nuevo plásmido pC-REX II (es decir, EPEIUS-REX) en el que se ha insertado el gen GM-CSF de la citoquina terapéutica.

[0055] La figura 17A-G muestra una serie compleja de promotores auxiliares situada en posición proximal al gen indicador HStk utilizando los emplazamientos MCS de pC-REX-II.

[0056] La figura 17H muestra un análisis Western Blot de la expresión diferencial del gen en células tumorales procedentes de los promotores auxiliares que se muestran en las Figuras 17A-G.

10 **[0057]** La figura 18 muestra la secuencia de ácido nucleico de la secuencia promotora de CMV procedente de pIRES.

[0058] La figura 19A muestra un sistema colector de bucle cerrado para la producción de vectores dirigidos.

[0059] La figura 19B facilita información relativa a los componentes del sistema colector de bucle cerrado.

Descripción detallada

15 **[0060]** El sistema dirigido de administración focaliza los vectores retrovirales o cualquier otro vector, proteína o medicamento viral o no viral, de forma selectiva, a las áreas de patología (es decir, direccionamiento patotrópico) activando la administración preferencial del gen en lesiones vasculares (Hall y otros, Hum Gene Ther, 8: 2183-92,1997; Hall y otros, Hum Gene Ther, 11: 983-93,2000) o cancerosas (Gordon y otros, Hum Gene Ther 12: 193-204,2001; Gordon y otros, Curiel DT, Douglas JT, eds. Vector Targeting Strategies for Therapeutic Gene Delivery, New York, NY: WileyLiss, Inc. 293-320,2002), áreas de angiogénesis activas, y en áreas de lesiones o inflamación de tejidos, con una elevada eficiencia in vivo.

20

[0061] Los métodos que se describen en el presente documento incluyen la utilización de partículas virales y no virales que contienen una proteína con una superficie modificada para focalizar el vector con respecto a la histopatología de una lesión - en lugar de las células objetivo per se - para optimizar la concentración efectiva del vector en las áreas de patología. Cuando se inyecta por vía intravenosa, el vector patotrópico se acumula en las lesiones cancerosas, áreas de angiogénesis activa, lesiones neoplásicas, puntos de metástasis, emplazamientos quirúrgicos, áreas de lesiones vasculares, puntos de inflamación o cualquier área en la que se haya producido una destrucción de tejidos. Este aumento deseado de la funcionalidad aumenta de forma drástica la seguridad y la eficacia del vector de terapia genética de circulación.

25

Definición

[0062] A menos que se defina en otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende en general cualquier experto en la materia a la que se refiere la invención. En el caso de que exista una pluralidad de definiciones para los términos incluidos en el presente documento, prevalecerán las que se incluyen en esta sección. Cuando se haga referencia a una URL o a cualquier otro identificador o dirección similar, se entenderá que dichos identificadores pueden cambiar, y que la información específica publicada en Internet puede variar, pero que puede encontrarse información equivalente buscando en Internet. Las referencias demuestran la disponibilidad y la divulgación pública de dicha información.

30

35

[0063] Según se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico" se refiere a un polinucleótido que contiene al menos dos subunidades de nucleótidos o análogas a nucleótidos unidas mediante enlaces covalentes. Un ácido nucleico puede ser un ácido desoxirribonucleico (ADN), un ácido ribonucleico (ARN) o un análogo de ADN o ARN. Los análogos de nucleótidos se encuentran disponibles comercialmente y se conocen métodos de preparación de polinucleótidos que contengan dichos análogos de nucleótidos (Lin y otros (1994) Nucl. Acids Res. 22: 5220-5234; Jellinek y otros (1995) Biochemistry 34: 11363-11372; Pagratis y otros (1997) Nature Biotechnol. 15: 68-73). El ácido nucleico puede ser monocatenario, bicatenario, o una mezcla de los mismos. A los efectos del presente documento, y a menos que se especifique en otro sentido, el ácido nucleico es bicatenario, o se desprende del contexto.

40

45

[0064] Según se utiliza en el presente documento, se supone que el ADN incluye todos los tipos y tamaños de moléculas de ADN, incluyendo cADN, plásmidos y ADN que incluya nucleótidos modificados y análogos de nucleótidos.

[0065] Según se utiliza en el presente documento, los nucleótidos incluyen nucleótidos mono-, di- y tri-fosfatos. Los nucleótidos también incluyen nucleótidos modificados, incluyendo, sin limitación, nucleótidos fosforotioato y nucleótidos de deazapurina, así como otros análogos de nucleótidos.

50

[0066] Según se utiliza en el presente documento, el término "paciente" se refiere a animales, plantas, insectos y aves en los que pueden introducirse las grandes moléculas de ADN. Se incluyen los organismos superiores, como

los mamíferos y aves, incluyendo humanos, primates, roedores, ganado, cerdos, conejos, cabras, ovejas, ratones, ratas, cobayas, gatos, perros, caballos, pollos y otros.

5 **[0067]** Según se utiliza en el presente documento, “administración a un paciente” es un procedimiento mediante el cual uno o más agentes de administración y/o grandes moléculas de ácido nucleico, juntos o por separado, se introducen en un paciente o se aplican al mismo de forma que las células objetivo que se encuentran presentes en el paciente se ponen en contacto con el paciente y/o las grandes moléculas de ácido nucleico.

10 **[0068]** Según se utiliza en el presente documento, “vector de administración dirigida” o “vehículo de administración dirigida” se refiere a partículas retrovirales que albergan y transportan moléculas exógenas de ácido nucleico hacia una célula o tejido de destino. “Dirigido”, según se utiliza en el presente documento, se refiere al uso de ligandos asociados al vehículo de administración y que orientan el vehículo hacia una célula o tejido específicos. Los ligandos incluyen, sin limitación, anticuerpos, receptores y dominios de enlace de colágeno.

15 **[0069]** Según se utiliza en el presente documento, “administración”, que se utiliza indistintamente con “transducción” se refiere a los procesos mediante los que las moléculas de ácido nucleico se transfieren a una célula de tal forma que se sitúen en interior de la célula. La administración de ácidos nucleicos es un proceso diferente de la expresión de ácidos nucleicos.

20 **[0070]** Según se utiliza en el presente documento, un “punto de clonación múltiple” (MCS) es una región de ácido nucleico de un plásmido que contiene múltiples puntos enzimáticos de restricción, pudiendo utilizarse cualquiera de los mismos en conjunción con una tecnología recombinante estándar para digerir el vector. “Digestión de la enzima de restricción” se refiere a una escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona únicamente en puntos específicos de una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción se encuentran disponibles comercialmente. La utilización de dichas enzimas es perfectamente conocida por las personas versadas en la materia. Frecuentemente, un vector se linealiza o se fragmenta utilizando una enzima de restricción que se corta en el MCS para permitir que se ligen secuencias exógenas al vector.

25 **[0071]** Según se utiliza en el presente documento, “origen de replicación” (frecuentemente denominado “ori”) es una secuencia específica de ácido nucleico en la que se inicia la replicación. Alternativamente, puede utilizarse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es una levadura.

30 **[0072]** Según se utiliza en el presente documento, “marcadores seleccionables o filtrables” confieren un cambio identificable a una célula, permitiendo identificar con facilidad las células que contienen un vector de expresión. Por lo general, un marcador seleccionable confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador positivo seleccionable es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es uno cuya presencia impide su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a medicamentos.

35 **[0073]** Por lo general, la inclusión de un marcador de selección de medicamento ayuda a la clonación e identificación de los transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol constituyen marcadores seleccionables útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes en función de la implementación de unas condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores, incluyendo marcadores filtrables como el GFP, que se basa en el análisis calorimétrico. Alternativamente, pueden utilizarse enzimas filtrables como la timidina quinasa (tk) del virus del herpes simplex o el cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Una persona versada en la materia sabría también cómo utilizar marcadores inmunológicos, posiblemente en conjunción con un análisis FACS. No se cree que el marcador utilizado revista importancia, en la medida en que sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto genético. Una persona versada en la materia conoce perfectamente ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y filtrables.

45 **[0074]** El término “transfección” se utiliza en el presente documento para hacer referencia a la absorción de un ADN ajeno por parte de una célula. Una célula se ha “transfectado” cuando se ha introducido ADN exógeno en el interior de la membrana celular. Por lo general se conocen diversas técnicas de transfección. Véase, por ejemplo, Graham y otros, *Virology* 52: 456 (1973); Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989); Davis y otros, *Basic Methods in Molecular Biology* (1986); Chu y otros, *Gene* 13: 197 (1981). Estas técnicas se pueden utilizar para introducir una o más porciones de ADN exógeno, como un vector de integración de nucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico en unas células de acogida adecuadas. El término incluye los procedimientos de transfección químicos, eléctricos y mediados por virus.

55 **[0075]** Según se utiliza en el presente documento, “expresión” se refiere al proceso mediante el cual el ácido nucleico se traduce en péptidos o se transcribe en ARN, que por ejemplo, puede traducirse en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido nucleico se obtiene a partir del ADN genómico, la expresión puede incluir, si se selecciona un organismo o célula eucariótica adecuados, la división del mRNA. Para expresar el ácido nucleico en una célula huésped, debe administrarse inicialmente en la célula, y una vez en ella, residir en último término en el núcleo.

[0076] Según se utiliza en el presente documento, “aplicación a un paciente” es un procedimiento mediante el cual las células dirigidas presentes en el paciente se hacen entrar en contacto con una fuente de energía, como ultrasonidos o energía eléctrica. Aplicación se refiere a cualquier proceso mediante el cual se aplica energía.

[0077] El término “célula huésped” se refiere, por ejemplo, a microorganismos, células de levadura, células de insectos, y células de mamíferos, que pueden ser utilizadas como recipientes de constructos múltiples, para producir un vector de administración dirigida. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. De este modo, una “célula huésped” según se utiliza en el presente documento suele referirse a una célula que se ha transfectado con una secuencia exógena de ADN. Se entiende que la progenie de una sola célula parental no tiene por qué ser necesariamente completamente idéntica en su morfología, o en su genómica, o en su complemento de ADN total, a su ascendiente original, debido a mutaciones naturales, accidentales o deliberadas.

[0078] Según se utiliza en el presente documento, “terapia genética” implica la transferencia de ADN heterólogo a ciertas células, células objetivo, de un mamífero, especialmente un ser humano, que sufre un trastorno o unos síntomas para los cuales se busca una terapia o un diagnóstico. El ADN se introduce en las células objetivo seleccionadas de tal forma que se exprese el ADN heterólogo y se obtenga de esa forma un producto terapéutico codificado por éste. Alternativamente, el ADN heterólogo puede mediar en cierta forma la expresión del ADN que codifica el producto terapéutico pudiendo codificar un producto, tal como un péptido o un ARN que en cierta forma medie, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La terapia genética también se puede utilizar para administrar un ácido nucleico que codifique un producto genético para la sustitución de un gen defectuoso o para suplementar un producto genético producido por el mamífero o por la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un compuesto terapéutico como un inhibidor del factor de crecimiento del mismo, o un factor de necrosis tumoral o inhibidor del mismo, como un receptor, que no se produce normalmente en el mamífero de acogida o que no se produce en cantidades terapéuticamente efectivas o en un momento terapéuticamente útil. El ADN heterólogo que codifica el producto terapéutico puede modificarse con anterioridad a la introducción en las células del organismo de acogida afectado a fin de mejorar o alterar en otra forma el producto o la expresión del mismo.

[0079] Según se utiliza en el presente documento, “secuencia heteróloga de ácido nucleico” suele ser ADN que codifica ARN y proteínas que no son normalmente producidas in vivo por la célula en la que se expresa o que media o codifica mediadores que alteran la expresión del ADN endógeno afectando a la transcripción, a la traducción o a otros procesos bioquímicos regulables. Una secuencia heteróloga de ácido nucleico puede también denominarse ADN ajeno. Cualquier ADN que una persona versada en la materia reconozca o considere heterólogo o ajeno a la célula en la que se expresa se encuentra en este caso compuesto por ADN heterólogo. Los ejemplos de ADN heterólogo incluyen, sin limitación, el ADN que codifica proteínas marcadoras trazables, como una proteína que confiera resistencia a los medicamentos, un ADN que codifique sustancias terapéuticamente efectivas, como agentes anticáncer, enzimas y hormonas, y un ADN que codifique otros tipos de proteínas, como los anticuerpos. Los anticuerpos que se condifican mediante ADN heterólogo pueden secretarse o expresarse en la superficie de la célula en la que se ha introducido el ADN heterólogo.

Plásmidos

[0080] Los plásmidos que se describen en este documento se utilizan para transfectar y producir vectores de administración dirigida para su utilización en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico. En general, dichos plásmidos proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican componentes virales o no virales de los vectores dirigidos descritos en este documento. Dichos plásmidos incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, la proteína anfotrópica de envoltura 4070A modificada para contener un dominio de enlace de colágeno. Entre los plásmidos adicionales se puede incluir una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor. Por lo general, la secuencia incluye un polipéptido retroviral gag-pol. El plásmido también incluye una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y la secuencia codifica un polipéptido que confiere a la célula productora resistencia a los medicamentos. También se incluye un origen de replicación. Los plásmidos adicionales pueden incluir una secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica un polipéptido de diagnóstico o terapéutico, secuencias de repetición terminal larga 5' y 3' (LTRs), una secuencia de empaquetado retroviral ψ , un promotor CMV antepuesto a la LTR 5', una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y un origen de SV40 de replicación.

[0081] Por lo general, la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un polipéptido de diagnóstico o terapéutico. En realizaciones específicas, la proteína o polipéptido terapéutico es una “proteína suicida”, que provoca la muerte celular por sí misma o en presencia de otros compuestos. Un ejemplo representativo de dicha proteína suicida es la timidina quinasa del virus del herpes simplex. Entre los ejemplos adicionales se incluyen la timidina quinasa del virus de la varicela zoster, el gen bacterial de la citosina deaminasa (que convierte la 5-fluorocitosina en el compuesto altamente tóxico 5-fluoruracil) la p450 oxidoreductasa, la carboxypeptidasa G2, la beta-glucuronidasa, la penicilina-V-amidasa, la penicilina-G-amidasa, la beta-lactamasa, la nitroreductasa, la carboxipeptidasa A, la linamarasa (también denominada beta-glucosidasa), el gen gpt del E. coli, y el gen Deo del E. coli, aunque se conocen otros en la técnica. En algunas realizaciones, la proteína suicida convierte un promedimento en un compuesto tóxico. En la forma que se utiliza en este documento, “promedimento” significa cualquier compuesto útil para los métodos de la presente invención y que pueda convertirse en un producto tóxico, es decir, tóxico para

las células tumorales. El promedicamento se convierte en un producto tóxico mediante la proteína suicida. Entre los ejemplos representativos de dichos promedicamentos destacan: el ganciclovir, el acyclovir, y el FIAU (1- (2-deoxi-2-fluoro-.beta.-D-arabinofuranosil)-5-iod-uracil) para la timidina quinasa; la ifosfamida para la oxidoreductasa; el 6-metoxipurina-arabinósido para la VZV-TK; la 5-fluorocitosina para la citosina deaminasa; la doxorubicina para la beta-glucuronidasa; el CB1954 y el nitrofurazone para la nitroreductasa; y el N- (Cianoacetyl) -L-fenilalanina o el N-(3-cloropropionil)-L-fenilalanina para la carboxipeptidasa A. El promedicamento puede ser fácilmente administrado por una persona comúnmente versada en la materia. Una persona versada en la materia podría determinar fácilmente la dosis y la vía más adecuadas para la administración del promedicamento.

[0082] En algunas realizaciones, una proteína terapéutica o polipéptido es un supresor del cáncer, por ejemplo, p53 o Rb, o un ácido nucleico que codifique dicha proteína o polipéptido. Por supuesto, las personas versadas en la materia conocen una amplia variedad de dichos supresores del cáncer y cómo obtenerlos, y/o los ácidos nucleicos que los codifican.

[0083] Entre otros ejemplos de proteínas o polipéptidos terapéuticos se incluyen las proteínas y polipéptidos terapéuticos pro-apoptóticos, por ejemplo, p15, p16, o p21. sup. WAF-1.

[0084] Las citoquinas, y el ácido nucleico que las codifica, pueden también utilizarse como proteínas y polipéptidos terapéuticos. Entre los ejemplos destacan: GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos); la TNF-alfa (factor alfa de necrosis tumoral); los interferones, incluyendo sin limitación IFN-alfa e IFN-gamma; y las interleucinas, incluyendo sin limitación la interleucina-1 (IL1), la interleucina-beta (IL-beta), la interleucina-2 (IL2), la interleucina-4 (IL4), la interleucina-5 (IL5), la interleucina-6 (IL6), la interleucina-8 (IL8), la interleucina-10 (IL10), la interleucina-12 (IL12), la interleucina-13 (IL13), la interleucina-14 (IL14), la interleucina-15 (IL15), la interleucina-16 (IL16), la interleucina-18 (IL18), la interleucina-23 (IL23), o la interleucina- 24 (IL24), aunque en la técnica se conocen otras realizaciones.

[0085] Entre los ejemplos adicionales de genes citocidales se incluyen sin limitación genes mutados de la ciclina G1. A modo de ejemplo, el gen citocidal puede ser una mutación dominante negativa de la proteína de la ciclina G1 (por ejemplo, WO/01/64870).

[0086] Anteriormente, los constructos de vector retroviral (RV) se producían mediante la clonación y la fusión de dos plásmidos retrovirales (RV) independientes, en los que uno contiene los LTRs retrovirales, las secuencias de empaquetado y los genes de interés respectivos, mientras que el otro incluye el vector retroviral que contiene un potente promotor (por ejemplo, CMV), así como todo un catálogo de secuencias funcionales ajenas. El vector pC-REX II (e-REX) que se describe en el presente documento hace referencia a un plásmido mejorado que contiene una inserción de un conjunto único de puntos de clonación en el plásmido primario para facilitar la clonación direccional del gen experimental. El promotor potente (por ejemplo, CMV) se utiliza en el esqueleto del plásmido para aumentar la cantidad de mensajes de ARN generados en el interior de las células productoras receptoras, pero no se encuentra empaquetado en la partícula retroviral, ya que recae fuera del ámbito de los LTRs retrovirales que flanquean al gen.

[0087] Por lo tanto, se diseñó un plásmido mejorado que incluía el promotor potente CMV (obtenido por PCR) en un punto estratégico del interior del vector GlxSvNa, que anteriormente había sido aprobado por la FDA para su uso en humanos, eliminando de este modo las preocupaciones relativas al tamaño del plásmido y a la secuencia que se daban con los vectores anteriormente anunciados. Este constructo mejorado se designó como pC-REX. El PC-REX se modificó adicionalmente para incorporar una serie de puntos únicos de clonación (véase MCS en pC-REX II, figura 14), lo que permite la clonación direccional y/o la inserción de múltiples genes, así como de dominios funcionales auxiliares. De este modo, los nuevos plásmidos se denominaron pC-REX y pC-REX II (EPEIUS-REX o eREX). El diseño del plásmido pC- REX (véase la figura 11A) superó en prestaciones al del pHIT-112/pREX en comparaciones directas. El diseño del nuevo plásmido se modificó adicionalmente para que incluyese la secuencia de codificación de diversos polipéptidos terapéuticamente efectivos. En un ejemplo, la Ciclina dominante negativa Gl (dnGl) (Véase figura 11B) se incluyó como gen terapéutico. La partícula viral tipartita (constructo vector del gen env, gag-pol, y dnGl) se ha denominado colectivamente REXIN-GTM en los informes publicados en relación con los ensayos clínicos. De este modo, REXIN-G representa el vector de administración dirigida dnGl/C-REX empaquetado, encapsulado y envuelto en una partícula viral dirigida e inyectable.

[0088] Se incluye un ligando de dirección en un plásmido descrito en el presente documento. Por lo general, se inserta entre dos residuos de aminoácido numerados consecutivamente de la región de enlace del receptor nativo (es decir, sin modificar) del envoltorio retroviral codificado por una secuencia de ácido nucleico de un plásmido como el polipéptido de envoltorio CAE anfotrópico modificado, en la que el polipéptido de dirección se inserta entre los residuos de aminoácido 6 y 7. El polipéptido es una porción de una proteína conocida como gp70, que se incluye en el envoltorio anfotrópico del Virus de la Leucemia Murina de Moloney. En general, el polipéptido de dirección incluye una región de enlace que se une a un componente matricial extracelular, incluyendo sin limitación colágeno (incluyendo colágeno tipo I y colágeno tipo IV), laminina, fibronectina, elastina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y secuencias que se enlazan a la fibronectina, como las secuencias arginina-glicina-ácido aspártico, o RGD. Las regiones de enlace que pueden incluirse en el polipéptido de dirección incluyen, sin limitación, dominios de polipéptido que constituyen dominios funcionales del factor de von Willebrand o derivados de los mismos,

enlazándose dichos dominios de polipéptido al colágeno. En la presente invención, la región de enlace es un polipéptido con la siguiente fórmula estructural: Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe-Met-Ala-Leu-Ser.

Métodos de obtención de vectores dirigidos

5 **[0089]** La presente invención se refiere a la producción de partículas de vector retroviral con una proteína que cuenta con una superficie viral modificada o dirigida, como por ejemplo, un polipéptido de envoltorio viral dirigido, en el que dicha proteína superficial viral modificada, como un polipéptido de envoltorio viral modificado incluye un polipéptido de dirección con una región de enlace que se une a un componente matricial extracelular como el colágeno. El polipéptido de dirección puede situarse entre dos residuos consecutivos de aminoácido de la proteína superficial viral, o puede sustituir a los residuos de aminoácido que se han eliminado de la proteína superficial viral.

10 **[0090]** Uno de los sistemas de administración más frecuentemente utilizados para la consecución de la terapia genética incluye los vectores virales, y normalmente, los vectores adenovirales y retrovirales. Entre los ejemplos de vehículos basados en virus se incluyen, sin limitación, los retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; La patente estadounidense N° 5,219, 740; WO 93/11230; WO 93/10218; La patente estadounidense N° 4,777, 127; La patente británica N° 2,200, 651; EP 0 345 242; y WO 15 91/02805), vectores basados en alfa-virus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, el virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), el virus del Río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y el virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR- 1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véase, por ejemplo, WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede recurrirse a la administración de ADN enlazado al adenovirus neutralizado, como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147.

20 **[0091]** A los efectos de la administración del gen, puede desarrollarse una partícula viral a partir un virus nativo de una célula objetivo o de un virus no nativo de la célula objetivo. En general, resulta deseable utilizar un vector viral no nativo en lugar de un vector viral nativo. Aunque los vectores virales nativos pueden poseer una afinidad natural por las células objetivo, dichos virus plantean un mayor riesgo, ya que poseen un mayor potencial de propagación en las células objetivo. A este respecto, los vectores de virus animales, tanto si están diseñados naturalmente o no para su propagación en células humanas, pueden resultar útiles para la administración del gen en células humanas. Sin embargo, para obtener una producción suficiente de dichos vectores de virus animales para su uso en la administración del gen es necesario llevar a cabo la producción en una célula de empaquetado animal nativa. Los vectores virales producidos de este modo, sin embargo, suelen carecer de algún componente, bien como parte del envoltorio o como parte de la cápside, que puede aportar tropismo para las células humanas. Por ejemplo, la práctica actual para la producción de vectores de virus no humanos, como los retrovirus ecotrópicos del ratón (murinos), como el MMLV, se producen en líneas celulares de empaquetado procedentes de ratones. Debe facilitarse otro componente requerido para el tropismo hacia las células humanas.

25 **[0092]** En general, la propagación de un vector viral (sin un virus colaborador) se desarrolla en una célula de empaquetado en la que se ha integrado de forma estable una secuencia de ácido nucleico para el empaquetado de los componentes en el genoma celular y se ha introducido la codificación del ácido nucleico para el ácido nucleico viral en dicha línea celular. Las líneas de empaquetado actualmente disponibles generan clones productores con una titulación suficiente para la transducción de células humanas para aplicaciones de terapia genética y han dado lugar al inicio de ensayos clínicos con pacientes humanos. No obstante, existen dos áreas en las que estas líneas son deficientes.

30 **[0093]** En primer lugar, el diseño de los vectores retrovirales apropiados para aplicaciones específicas exige la construcción y comprobación de diversas configuraciones de vector. Por ejemplo, Belmont y otros, Molec. and Cell. Biol. 8 (12): 5116-5125 (1988), construyeron líneas productoras estables a partir de 16 vectores retrovirales para identificar al vector capaz de producir tanto el productor con la mayor titulación y la obtención de la expresión óptima. Algunas de las configuraciones examinadas incluyen: (1) la expresión orientada por LTR frente a un promotor interno; (2) la selección de un promotor interno obtenido a partir de un gen viral o celular; y (3) si se ha incorporado al constructo un marcador seleccionable. Un sistema de empaquetado que permitiría una rápida producción de virus de alta titulación sin necesidad de generar líneas productoras estables resultaría enormemente ventajoso en el sentido de que ahorraría aproximadamente dos meses necesarios para la identificación de clones productores de alta titulación obtenidos a partir de varios constructos.

35 **[0094]** En segundo lugar, en comparación con las células NIH 3T3, la eficiencia de la infección de los cultivos primarios de células somáticas de mamíferos con un productor de retrovirus anfotrópico de alta titulación varía considerablemente. La eficiencia en la transducción de mioblastos murinos (Dhawan y otros, Science 254: 1509-1512 (1991) o células endoteliales capilares de rata (Yao et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 8101-8105 (1991)) demostró ser aproximadamente igual a la de las células NIH 3T3, mientras que la eficiencia en la transducción de hepatocitos caninos (Armentano et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6141-6145 (1990)) fue de tan sólo un 25% de la obtenida con las células NIH 3T3. Los linfocitos de infiltración en tumores humanos primarios ("TILs"), las células humanas CD4+ y CD8+ T aisladas a partir de linfocitos sanguíneos periféricos, y las células madre hematopoyéticas reconstituyentes a largo plazo procedentes de primates representan un ejemplo extremo de baja eficiencia en la transducción, en comparación con las células NIH 3T3. En una ocasión se informó de que las células humanas

purificadas CD4+ y CD8+ T se infectaron a unos niveles del 6%-9% con sobrenadantes procedentes de clones productores estables (Morecki y otros, Cancer Immunol. Immunother. 32: 342-352 (1991)). Si el vector del retrovirus contiene el gen neoR, pueden obtenerse poblaciones altamente enriquecidas en células sometidas a transducción mediante selección en G418. No obstante, se ha demostrado que la expresión de un marcador seleccionable presenta efectos perjudiciales sobre la expresión a largo plazo del gen in vivo en células madre hematopoyéticas (Apperly et. al. Blood 78: 310- 317 (1991)).

[0095] Para superar estas limitaciones, se dispone de nuevos métodos y composiciones para sistemas de empaquetado de transfección transitoria. Las mejoras en el diseño del vector retroviral permiten cuanto sigue: (1) la sustitución de los engorrosos procedimientos de clonación y fusión de plásmidos que representan la técnica anterior, (2) la provisión de un único constructo plásmido directo que evite las fusiones y mutaciones indebidas de los constructos progenitores, lo que comprometería el reactivo a la hora de obtener la aprobación del regulador (es decir, la FDA), (3) la eliminación de secuencias redundantes, inoperativas y/o no deseables del vector retroviral resultante (4) una mayor flexibilidad en la selección y clonación direccional de constructos genéticos terapéuticos en el vector retroviral, (5) facilitación de la clonación molecular de diversos dominios auxiliares en el vector retroviral, (6) la introducción de modificaciones estratégicas que aumenten de forma demostrable los resultados del plásmido progenitor en el contexto de las células productoras del vector, aumentando de este modo la potencia resultante del producto del vector retroviral (7) una importante reducción del tamaño global del vector retroviral en la medida en que la producción del plásmido aumenta desde un reactivo "con un escaso número de copias y bajo rendimiento" en fermentaciones biológicas hasta uno de rendimiento intermedio. En su conjunto, estas modificaciones conservan las virtudes (en términos de seguridad del vector, incorporación del gen y expresión del gen) de los vectores retrovirales actualmente utilizados, aportando importantes mejoras a la construcción, validación, fabricación y rendimiento de posibles vectores retrovirales para una terapia genética humana. Esto representa el segundo componente de TDS e incluye un vector de expresión retroviral de alto rendimiento, designado como vector C-REX.

[0096] La transfección transitoria presenta numerosas ventajas frente al método de células de empaquetado. A este respecto, la transfección transitoria evita el período más prolongado necesario para generar líneas celulares estables de producción de vectores y se utiliza en el caso de que el genoma del vector de los componentes de empaquetado retroviral resulte tóxico para las células. Si el genoma del vector codifica genes tóxicos o genes que interfieran con la replicación de la célula de acogida, como los inhibidores del ciclo celular o genes inductores de la apoptosis, puede resultar difícil generar líneas celulares estables de producción de vectores, pero la transfección transitoria puede utilizarse para producir el vector antes de que mueran las células. Asimismo, se han desarrollado líneas celulares utilizando una transfección transitoria que produce niveles de titulación del vector que son comparables a los niveles obtenidos a partir de líneas celulares estables de producción vectorial (Pear et al 1993, PNAS 90: 8392-8396).

[0097] Se proporciona un proceso de fabricación de gran eficacia para la producción a gran escala de material de vectores retrovirales que incluyen constructos genéticos citocidales con una titulación en bruto y actividad biológica muy elevadas. El proceso de fabricación describe la utilización de células productoras 293T transfectadas transitoriamente; el diseño de un método de aumento de las células productoras; y un procedimiento de transfección transitoria que genera vectores retrovirales que retiene la expresión genética citocidal con una gran fidelidad.

[0098] Se proporciona un banco de células maestras 293T plenamente validadas (células renales embrionarias humanas transformadas mediante un antígeno grande T de SV40) para producir un vector retroviral clínico. Aunque las células 293T han generado pequeñas cantidades de material de vector con una titulación de moderada a alta, para su uso en laboratorio, no se ha demostrado previamente que estas células productoras resulten útiles para la producción a gran escala de material vectorial clínico. La FDA norteamericana regula y limita severamente la utilización de vectores que podrían transferir oncogenes intactos en los productos clínicos. El proceso de fabricación incorpora un método de degradación del ADN en las etapas finales de la recolección y recopilación de vectores que no produce ninguna pérdida de la potencia del vector. Se proporciona un método para la concentración de material retroviral vectorial para la generación consistente de vectores clínicos que se aproximen a 10^9 cfu/ml. La formulación final del producto clínico consiste en una solución libre de suero definida químicamente, para la recolección, recopilación y almacenamiento de material clínico de vector de alta titulación.

[0099] En la presente invención se proporciona un método de recopilación del vector clínico utilizando un sistema colector de bucle cerrado para el mantenimiento de la esterilidad, la toma de muestras para el control de calidad y la facilitación del relleno final. El sistema de colector de bucle cerrado (véanse las figuras 19A y 19B) está diseñado para ajustarse a las especificaciones necesarias para la recolección del producto clínico, es decir, el mantenimiento de la esterilidad durante el muestreo, la cosecha, la concentración y el llenado final, y no está disponible como un producto apto para su venta. El sistema de colector de bucle cerrado Para la recolección, concentración y almacenamiento de partículas virales que se describe en este documento comprende una bolsa tipo flexboy y un sistema colector formado por una película Stedim 71; una película película coextrusionada de tres capas que consta de una capa de contacto con el fluido fabricada con etil vinil acetato (EVA), una barrera al gas de etilen vinil alcohol (VEO) y una capa exterior de EVA. El espesor total de la película es de 300 mm. El EVA es una película inerte no basada en PVC, que no requiere la adición de plastificadores, por lo que se reducen al mínimo los desprendimientos. Stem ha llevado a cabo amplios ensayos de biocompatibilidad y ha establecido con la FDA un Archivo Master del Medicamento para este producto. La película y los tubos se ajustan a los requisitos de la clase VI

de la USP. La personalización de la bolsa se lleva a cabo en un entorno de fabricación controlada Stedim clase 10.000. La película, los tubos y todos los componentes utilizados son gamma compatibles hasta 45 kGy. La irradiación gamma se lleva a cabo con una exposición mínima de 25 kGy y una máxima de 45 kGy. Stedim y sus esterilizadores contratados han facilitado certificados de conformidad del producto.

5 **[00100]** El vector clínico se almacenó en volúmenes de 150 ml en criobolsas de 500 ml a 80° C. El producto plenamente validado presenta una titulación viral de 3×10^7 unidades de formación de colonias (unidades) pormilímetro, una potencia biológica de un 65-70% de actividad inhibitoria del crecimiento en células cancerígenas humanas correspondientes a cánceres de mama, colon y páncreas, un tamaño uniforme de partícula de ~100nm sin agregación viral, menos de 550 bp de ADN residual, lo que indica la ausencia de oncogenes intactos, ausencia de
10 antígenos detectables E1A o T grande SV40 y ausencia de retrovirus competente de replicación detectable (RCR) en cinco pases efectuados en células 293 humanas y de mus Dunni. El producto es estéril con un nivel de endotoxina de <0,3 EU/ml, y el extremo de las células de producción está libre de micoplasma y otros virus adventicios.

15 **[00101]** La envoltura viral incluye un ligando de dirección que incluye, sin limitación, la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico, o RGD, que enlaza la fibronectina, y un polipéptido que contiene la secuencia Gly-Gly-Trp-Ser-His-Trp, que también se enlaza a la fibronectina. Además de la región del enlace, el polipéptido de dirección puede también incluir secuencias de enlace de uno o más residuos de aminoácidos situadas en el extremo N y/o el extremo C de la región de enlace, aumentando dichos enlaces la flexibilidad rotacional y/o reduciendo al mínimo la obstrucción estérica del polipéptido de envoltura modificado. Los polinucleótidos pueden construirse mediante
20 técnicas de ingeniería genética conocidas por las personas versadas en la materia.

[00102] Un vector de administración dirigida contiene asociado al mismo un ligando que facilita la acumulación del vector en un punto objetivo, es decir, un ligando específico de objetivo. El ligando es una porción química, como una molécula, un grupo funcional o fragmento del mismo, que reacciona específicamente con el objetivo elegido, al tiempo que es poco reactivo con otros objetivos, facilitando de este modo al vector de administración dirigida la
25 ventaja de transferir selectivamente en las células ácidos nucleicos que codifican polipéptidos terapéuticos o de diagnóstico en las proximidades del objetivo elegido. "Reactivo" significa tener una afinidad de enlace hacia una célula o tejido, o ser capaz de internalizarse en una célula, en la que la afinidad de enlace se detecta mediante cualquier método conocido en la técnica, mediante cualquier ensayo in vitro estándar, como ELISA, citometría de flujo, inmunocitoquímica, resonancia de plasmones superficiales, etc. Por lo general, un ligando se enlaza con una
30 fracción molecular específica - un epítipo, como una molécula, un grupo funcional, o un complejo molecular asociado a una célula o tejido, formando un par de enlace de dos miembros. Se reconoce que en un par de enlace, cualquiera de sus miembros puede ser un ligando, mientras que el otro es un epítipo. Dichos pares de enlace son conocidos en la técnica. Entre los ejemplos de los pares de enlace se encuentran los formados por anticuerpo-antígeno, hormona-receptor, enzima-sustrato, nutriente (por ejemplo, vitamina)-proteína de transporte, factor de crecimiento-receptor del factor de crecimiento hidrato de carbono-lectina y dos polinucleótidos con secuencias complementarias. Los fragmentos de los ligandos deben considerarse un ligando y pueden utilizarse en la presente invención, en la medida en que el fragmento conserve la capacidad de enlazarse con el adecuado epítipo de la superficie celular. Preferiblemente, los ligandos son proteínas y péptidos que comprenden secuencias de enlace de
35 antígenos de una inmunoglobulina. Más preferiblemente, los ligandos son fragmentos de anticuerpo de enlace de antígenos que carecen de las secuencias Fc. Dichos ligandos preferidos son fragmentos Fab de una inmunoglobulina, fragmentos F(ab)₂ de inmunoglobulina, fragmentos de anticuerpos Fv, fragmentos de anticuerpos Fv monocatenarios. Estos fragmentos pueden obtenerse enzimáticamente o producirse de forma recombinante. En su aspecto funcional, los ligandos son preferiblemente ligandos internalizables, es decir, los ligandos que son internalizados por la célula seleccionada, por ejemplo, mediante un proceso de endocitosis. Igualmente, pueden utilizarse los ligandos con sustituciones u otras alteraciones, pero que conservan la capacidad de enlace de epítopos. Los ligandos se seleccionan ventajosamente para reconocer las células patológicas, por ejemplo, células malignas o agentes infecciosos. Los ligandos que se enlazan con el colágeno expuesto, por ejemplo, pueden focalizar el vector hacia un área de un paciente que incluya tejido maligno. En general, las células que han producido metástasis en otras áreas de un cuerpo la llevan a cabo invadiendo y perturbando el tejido sano. Esta invasión tiene
45 como resultado la exposición del colágeno, que puede ser dirigido por los vectores facilitados en el presente documento.

[00103] Un grupo adicional de ligandos que puede utilizarse para focalizar un vector son aquellos que forman un par de enlace con los receptores del factor de crecimiento de la tirosina quinasa que están sobreexpresados en la superficie de las células de muchos tumores. Entre los ejemplos de los factores de crecimiento de la tirosina quinasa
55 se encuentran el receptor VEGF, el receptor FGF, el receptor PDGF, el receptor IGF, el receptor EGF, el receptor TGF-alfa, el receptor TGF-beta, el receptor HB-EGF, el receptor ErbB2, el receptor ErbB3, y el receptor ErbB4. El receptor EGF VIII y los receptores ErbB2 (HER2) resultan especialmente preferidos en el contexto del tratamiento del cáncer utilizando INSERTOS, ya que estos receptores son más específicos para las células malignas, a pesar de que resultan más escasos en las normales. Alternativamente, los ligandos se seleccionan para que reconozcan las células que precisan corrección genética, o alteración genética mediante la introducción de un gen beneficioso, tal como células hepáticas, células epiteliales, células endocrinas en organismos genéticamente deficientes, células embrionarias in vitro, células germinales, células madre, células reproductoras, células híbridas, células vegetales, o cualquier tipo de células utilizadas en procesos industriales.

[00104] El ligando puede expresarse en la superficie de una partícula vírica o enlazarse con una partícula no vírica mediante cualquier método adecuado disponible en la técnica. El enlace puede ser covalente o no covalente, como por adsorción o formación de complejos. El enlace preferiblemente implica una fracción molecular lipofílica capaz de conjugarse con el ligando mediante la formación de un enlace covalente o no covalente, al que se denomina un "anclaje". Un anclaje presenta afinidad con entornos lipofílicos, como las micelas lipídicas, bicapas y otras fases condensadas, y fija el ligando a una micropartícula de ácido nucleico lipídico. Los métodos de anexión del ligando mediante un anclaje lipofílico son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, F. Schuber, "Chemistry of ligand-coupling to liposomes", en: *Liposomes as Tools for Basic Research and Industry*, ed. by J. R. Philippot and F. Schuber, CRC Press, Boca Raton, 1995, p. 21-37).

[00105] Se reconoce que los vectores de administración dirigida que se describen en este documento incluyen partículas retrovirales. Los métodos de encapsulación de virus en bicapas lipídicas son conocidos en la técnica. Incluyen el atrapamiento pasivo en vesículas bicapas lipídicas (liposomas) y la incubación de viriones con liposomas (patente estadounidense N° 5,962, 429; Fasbender, y otros, *J. Biol. Chem.* 272: 6479- 6489; Hodgson and Solaiman, *Nature Biotechnology* 14: 339-342 (1996)). Sin limitarnos por una teoría, asumimos que las proteínas ácidas expuestas en la superficie de un virión proporcionan un interfaz para la formación de complejos con el componente lipídico catiónico/polímero catiónico del vector de administración dirigida y sirve de "andamio" para la formación de bicapas por parte del componente lipídico neutro.

[00106] El tamaño de un vector de administración dirigida formado de acuerdo con esta invención se encuentra dentro de un margen de entre 40 y unos 1500 nm, preferiblemente dentro del margen situado entre 50-500 nm, y más preferiblemente, dentro del margen situado entre 20-150 nm. Ventajosamente, esta selección de tamaño sirve de ayuda al vector de administración dirigida, cuando se administra en el cuerpo, para penetrar desde los vasos sanguíneos en los tejidos enfermos, como tumores malignos, y transferir a su interior un ácido nucleico de uso terapéutico. También es una característica y una propiedad ventajosa del vector de administración dirigida el hecho de que su tamaño, medido por ejemplo mediante el método de la dispersión de luz dinámica, no aumenta sustancialmente en presencia fluidos biológicos extracelulares, como el medio de cultivo celular *in vitro* o el plasma sanguíneo.

[00107] Alternativamente, como se describe en Culver y otros (1992) *Science* 256,1550-1552, las células que producen retrovirus pueden inyectarse en un tumor. Las células productoras de retrovirus introducidas de esta forma están sometidas a un proceso de ingeniería para producir activamente un vector de administración dirigida, tal como una partícula de vector vírico, de forma que se produzca continuamente el vector dentro de la masa tumoral *in situ*. De este modo, la proliferación de las células tumorales puede transducirse con éxito *in vivo* si se mezcla con células productoras de vectores retrovirales.

Método de tratamiento

[00108] Los vectores dirigidos producidos mediante la presente invención también pueden utilizarse como parte de un protocolo de terapia genética para la producción de ácidos nucleicos que codifican un agente terapéutico, como un polipéptido mutante de ciclina-G. De este modo, los vectores de expresión se producen para la transfección *in vivo* o *in vitro* de un agente terapéutico en áreas de un sujeto que posee tipos celulares asociados a trastornos neoplásicos con metástasis. Los vectores dirigidos del presente documento están previstos para su utilización como vectores de terapia genética. El polipéptido mutante de la ciclina -G y las moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar para sustituir el correspondiente gen en otros vectores dirigidos. Alternativamente, un vector dirigido descrito en el presente documento (por ejemplo, uno que incluya un dominio de enlace de colágeno) puede contener un ácido nucleico que codifique cualquier agente terapéutico (por ejemplo, timidina quinasa). También son interesantes los agentes terapéuticos que resultan útiles para el tratamiento de los trastornos neoplásicos.

[00109] Este estudio aporta datos generados a partir de ensayos clínicos *in vivo* realizados en humanos. No obstante, la toxicidad adicional y la eficacia terapéutica de los vectores dirigidos que se describen en el presente documento, pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para la determinación de la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La proporción entre dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como el coeficiente LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren las dosis que presentan grandes índices terapéuticos. Pueden utilizarse dosis que normalmente presentarían efectos secundarios tóxicos, ya que el sistema de administración está diseñado para direccionar el punto de tratamiento, a fin de minimizar los daños a las células no tratadas y reducir los efectos secundarios.

[00110] Los datos obtenidos a partir de los ensayos clínicos en humanos (véase más adelante) demuestran que el vector dirigido generado por la invención opera *in vivo* inhibiendo el avance de un trastorno neoplásico. Los datos que figuran en la tabla 1 proporcionan un régimen de tratamiento para la administración de dicho vector a un paciente. Además, los datos obtenidos a partir de ensayos en cultivos celulares y estudios con animales, utilizando formas alternativas del vector dirigido, (por ejemplo, un mecanismo alternativo de dirección o un agente terapéutico alternativo) se pueden usar para formular un rango de dosificaciones para su utilización con seres humanos. Preferiblemente, la dosis se sitúa dentro de un rango de concentraciones circulatorias que incluye la ED_{50} con escasa o nula toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango, en función del formato de dosificación utilizado

y la vía de administración empleada. Puede calcularse inicialmente una dosis terapéuticamente efectiva a partir de ensayos en cultivos celulares. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir una gama de concentraciones de plasma circulatorio que incluya la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue una infección media-máxima o una inhibición media-máxima) de acuerdo con lo determinado en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles de plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante una cromatografía líquida de alta eficacia.

[00111] Pueden formularse mediante cualquier método convencional composiciones farmacéuticas que contengan un vector de administración dirigida, mezclando la cantidad seleccionada del vector con uno o más medios o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, el vector de administración dirigida puede estar suspendido en un medio como el PBS (solución salina con tampón de fosfato). Los compuestos activos se pueden administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica, en forma líquida, semilíquida o sólida, y se formulan de una forma adecuada para cada vía de administración. Entre los modos preferidos de administración se incluyen las vías de administración oral y parenteral.

[00112] El vector de administración dirigida y las sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para su administración por inhalación o insuflado (bien a través de la boca o de la nariz) o para su administración por vía oral, bucal, parenteral o rectal. Para su administración por inhalación, el vector de administración dirigida puede administrarse en forma de aerosol en spray mediante contenedores presurizados o en forma de nebulizador, utilizando un propelente adecuado, como el diclorodifluorometano, el triclorofluorometano, el diclorotetrafluoroetano, el dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse instalando una válvula que administre una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina, para ser utilizados con un inhalador o insuflador pueden formularse de forma que contengan una mezcla en polvo de un compuesto terapéutico y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.

[00113] Para su administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas pueden adoptar la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacológicamente aceptables, tales como agentes de enlace (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinil pirrolidona o hidroxipropil metil celulosa); excipientes (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o calcio hidrogenofosfato); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegradores (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Los comprimidos pueden estar revestidos mediante métodos perfectamente conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para su administración oral pueden, por ejemplo, adoptar la forma de soluciones, jarabes o suspensiones, o presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su utilización. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse a través de medios convencionales con aditivos farmacológicamente aceptables como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de la celulosa, o graas hidrogenadas comestibles); agentes de emulsión (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres grasos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampón, y agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, en la medida adecuada.

[00114] Las preparaciones para su administración por vía oral pueden formularse adecuadamente para conseguir la liberación controlada del compuesto activo. Para su administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o tabletas formuladas de forma convencional.

[00115] El vector de administración dirigida puede formularse para su administración por vía parenteral mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones inyectables pueden presentarse en forma de dosis unitarias, por ejemplo, en viales, o en contenedores multidosis, añadiéndose un conservante. Las composiciones pueden adoptar la forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios, como agentes suspensotes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede presentarse en forma de polvo liofilizado para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua esterilizada libre de pirógenos, antes de su utilización.

[00116] Además de las formulaciones que se han descrito anteriormente, el vector de administración dirigida puede también formularse como una preparación de liberación lenta. Dichas formulaciones de actividad prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De este modo, por ejemplo, los compuestos terapéuticos pueden formularse con materiales adecuados poliméricos o hidrófobos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

[00117] Los agentes activos pueden formularse para su aplicación local o tópica, como por ejemplo, para su aplicación tópica en las membranas dérmicas y mucosas, como en los ojos, en forma de geles, cremas y lociones, y para aplicación ocular o para aplicación intracisternal o intraespinal. Dichas soluciones, y especialmente las diseñadas para su uso oftálmico, pueden formularse como soluciones isotónicas 0,01%-10%, con un pH de entre 5 y 7, con las sales adecuadas. Los compuestos pueden formularse como aerosoles para su aplicación tópica, como por ejemplo mediante inhalación.

[00118] La concentración del compuesto activo en la composición del medicamento dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción del compuesto activo, del calendario de dosificación y de la cantidad administrada, así como de otros factores conocidos por cualquier persona versada en la materia. Por ejemplo, la cantidad que se administra es suficiente para tratar los síntomas de hipertensión.

5 **[00119]** Si así se desea, las composiciones pueden presentarse en un pack o dispositivo dispensador que puede contener uno o más formatos de dosificación unitaria que contengan el ingrediente activo. Por ejemplo, el pack puede incluir una lámina metálica o plástica, como un blíster. El pack o dispositivo dispensador puede ir acompañado de las instrucciones de administración.

10 **[00120]** Los agentes activos pueden empaquetarse como artículos de fabricación que contengan el material de envasado, un agente indicado en el presente documento y una etiqueta que indique el trastorno para el que se administra el agente.

15 **[00121]** La partícula retroviral dirigida que comprende el gen de la citoquina puede ser administrada por sí sola o en conjunción con otros tratamientos terapéuticos o agentes activos. Por ejemplo, la partícula retroviral dirigida que comprende un gen de citoquina puede administrarse con la partícula retroviral dirigida que comprende un gen citocídico. La cantidad de la partícula retroviral dirigida que comprende un gen citocídico y que va a administrarse se basa en la titulación de las partículas víricas, como se ha descrito anteriormente. A modo de ejemplo, si la partícula retroviral dirigida que comprende un gen de citoquina se administra en conjunción con la partícula retroviral dirigida que comprende un gen citocídico, la titulación de la partícula retroviral correspondiente a cada vector puede ser inferior si se utiliza cada vector por sí solo. La partícula retroviral dirigida que comprende un gen de citoquina puede administrarse simultáneamente o independientemente de la partícula retroviral dirigida que comprende el gen citocídico.

25 **[00122]** En este documento también se describen métodos para el tratamiento del cáncer mediante la administración de una partícula retroviral dirigida (por ejemplo, el vector retroviral dirigido que expresa una citoquina, bien por sí solo o en conjunción con el vector retroviral dirigido que expresa un gen citocídico) con uno o más agentes activos diferentes. Entre los ejemplos de los otros agentes activos que pueden utilizarse se incluyen, sin limitación, los agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, inhibidores de la proteasa, como los inhibidores de la proteasa del VIH, o análogos de nucleósidos, como el AZT. El agente o agentes activos pueden administrarse simultáneamente o por separado (por ejemplo, antes de la administración de la partícula retroviral dirigida o con posterioridad a la administración de la partícula retroviral dirigida) con respecto al agente o agentes activos. Cualquier persona versada en la materia se dará cuenta de que la partícula retroviral dirigida puede administrarse bien por la misma vía que el agente o agentes (es decir, tanto el vector retroviral dirigido como el agente se administran por vía intravenosa) o por vías diferentes (por ejemplo, el vector retroviral dirigido se administra por vía intravenosa y el agente o agentes se administran por vía oral).

35 **[00123]** Una cantidad efectiva o terapéuticamente efectiva de las partículas retrovirales dirigidas para su administración a un sujeto que precise tratamiento puede determinarse de diversas formas. Por ejemplo, la cantidad puede basarse en la titulación viral o la eficacia en un modelo animal. Alternativamente, los regímenes de dosificación utilizados en ensayos clínicos pueden utilizarse como directrices generales. La dosis diaria puede administrarse como una sola dosis o en porciones a varias horas del día. Inicialmente, puede ser necesaria una dosis más alta, pudiendo reducirse a lo largo del tiempo cuando se obtiene la respuesta inicial óptima. Por ejemplo, el tratamiento puede ser continuo durante días, semanas o años, o puede llevarse a cabo a intervalos, incluyendo períodos de descanso. La dosificación puede modificarse de acuerdo con el resto de tratamientos que pueda estar recibiendo el individuo. No obstante, el método de tratamiento no se limita en modo alguno a una concentración o gama de concentraciones específica de la partícula retroviral dirigida, y puede variar para cada individuo sometido a tratamiento, y para cada derivado utilizado.

45 **[00124]** Una persona versada en la materia se dará cuenta de que puede ser necesario llevar a cabo la individualización de la dosis a fin de conseguir el máximo efecto para una persona determinada. Dicha persona versada en la materia también entenderá que la dosis que se administra a un individuo sometido a tratamiento puede variar en función de la edad del individuo, gravedad y estadio de la enfermedad y la respuesta al curso de tratamiento. Una persona versada en la materia conoce los parámetros clínicos para evaluar y determinar la dosificación adecuada para el individuo que está tratándose mediante los métodos que se describen en el presente documento. Los parámetros clínicos que pueden evaluarse para la determinación de la dosis incluyen, sin limitación, el tamaño del tumor, la alteración en el nivel de marcadores tumorales utilizados en ensayos clínicos para malignidades específicas. En función de dichos parámetros, el médico determinará la cantidad terapéuticamente efectiva a utilizar con un individuo específico. Dichas terapias pueden administrarse con la frecuencia necesaria y durante el período de tiempo que el médico considere oportuno.

55 **[00125]** En el presente estudio, se han diseñado protocolos de ejemplo para pacientes con cáncer. Se aplicó diariamente durante 8-10 días un régimen de incremento gradual de la dosis entre pacientes mediante infusión intravenosa de Rixin-G. Tras completar este régimen se concedió una semana de descanso para evaluar la toxicidad; tras lo cual, se administró la dosis máxima tolerada de Rixin-G durante otros 8-10 días. Si el paciente no

desarrolló un evento adverso de grado 3 o 4 relacionado con la Regin-G durante los períodos de tratamiento, la dosis de Regin-G se aumentaba de la forma siguiente:

[00126] Tabla 1: Regímenes de tratamiento

| Día de tratamiento | Nivel de la Dosis | Dosis del Vector/Día |
|---|-------------------|---------------------------------|
| Día 1-6 Régimen de aumento de la dosis | I | 4,5 x 10 ⁹ Unidades |
| Día 7-8 | II | 9,0 x 10 ⁹ Unidades |
| Día 9.10 | III | 1,4 x 10 ¹⁰ Unidades |
| Día 18-27 (Régimen de dosis alta) | III | 1,4 x 10 ¹⁰ Unidades |

5

[00127] Basándose en la seguridad observada en los primeros dos pacientes, se sometió a un tratamiento avanzado a un tercer paciente con cáncer de páncreas en estadio IVB con numerosas metástasis en hígado, mediante Regin-G por vía intravenosa durante seis días, a lo que siguieron 8 dosis semanales de gemcitabine a 1000 mg/m² en un segundo protocolo clínico aprobado por la BFAD filipina.

10 **Kits**

[00128] También se proporcionan kits o sistemas de administración del medicamento que comprenden composiciones para ser utilizadas en los métodos que se describen en este documento. Todos los materiales y reactivos esenciales requeridos para la administración de la partícula retroviral dirigida pueden montarse en un kit (por ejemplo, constructo o línea celular de las células de empaquetado, vector de expresión de la citoquina). Los componentes del kit pueden aparecer en diversas formulaciones, como se ha descrito anteriormente. La partícula o partículas retrovirales dirigidas pueden formularse con uno o más agentes (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) en una sola composición farmacológicamente aceptable o en composiciones independientes farmacológicamente aceptables.

15

[00129] Los componentes de estos kits o sistemas de administración del medicamento pueden también suministrarse en formatos secos o liofilizados. Cuando los reactivos o componentes se proporcionan en formato seco, la reconstitución suele llevarse a cabo mediante la adición de un disolvente adecuado, que también puede facilitarse en otro contenedor. Los kits también pueden comprender instrucciones de dosificación e información sobre la administración de la partícula retrovital dirigida. Los kits o sistemas de administración del medicamento también incluirán normalmente un medio que contenga los viales cerrados para su venta comercial como contenedores inyectables o contenedores de plástico moldeados por soplado en los que se introducen los viales deseados. Independientemente del número o tipo de contenedores, los kits también pueden comprender o empaquetarse con un instrumento para ayudar en la inyección/administración o para la introducción de la composición compleja en el interior del cuerpo de un sujeto. Dicho instrumento puede ser un aplicador, inhalador, jeringa, pipeta, fórceps, cuchara de medida, cuentagotas o cualquier vehículo de administración médicamente aprobado.

20

25

30

[00130] Se proporciona un método para llevar a cabo una actividad comercial de terapia génica. El método incluye la generación de vectores de administración dirigida y el establecimiento de un banco de vectores mediante la recolección y suspensión de las partículas del vector en una solución con un medio adecuado y el almacenamiento de la suspensión. El método incluye asimismo la facilitación de las partículas, y las instrucciones de uso de las partículas, a un médico o profesional sanitario para su administración a un sujeto (paciente) que las precise. Dichas instrucciones de utilización del vector pueden incluir el ejemplo de régimen de tratamiento facilitado en la tabla 1. El método incluye opcionalmente la facturación al paciente o a la compañía aseguradora del paciente.

35

[00131] Se proporciona un método para llevar a cabo una actividad comercial de terapia génica, que incluye la facilitación de los kits descritos en este documento a un médico o profesional sanitario.

40

[00132] Se incluyen los siguientes ejemplos con fines exclusivamente ilustrativos, y no pretender limitar el alcance de la invención. Los métodos específicos facilitados como ejemplo pueden practicarse con otras especies. Los ejemplos pretenden ejemplificar procesos genéricos.

Ejemplos

5 [00133] El cáncer de páncreas es la cuarta principal causa de fallecimiento por cáncer en los Estados Unidos, y es el más mortal de todos los cánceres. La resección quirúrgica completa del tumor pancreático representa el único tratamiento efectivo contra esta enfermedad. Desgraciadamente, dichas operaciones “curativas” son posibles tan sólo en un 10% a un 15% de pacientes de cáncer de páncreas, normalmente aquellos individuos en los que el principal síntoma es la ictericia. El promedio de supervivencia de los pacientes con cáncer de páncreas no resecable es de 3 a 6 meses. Por tanto, la gestión del cáncer de páncreas avanzado suele enfocarse a paliar los síntomas. No parece que la radioterapia externa prolongue la supervivencia, aunque una suficiente reducción del tamaño del tumor puede conseguir aliviar el dolor. La adición de quimioterapia con fluoruracil (5-FU) a la radioterapia externa ha aumentado el tiempo de supervivencia de estos pacientes (18). Recientemente, la gemcitabine, un derivado de la deoxicitidina, ha demostrado que mejora la calidad de vida de los pacientes con un cáncer de páncreas avanzado, aunque la duración de la supervivencia se prolonga tan sólo en 8-10 semanas.

Ejemplo 1: Constructos

15 [00134] El plásmido pBv/CAEP contiene secuencias de codificación de la proteína de envoltura antropomórfica 4070A (número de serie de GenBank: M33469), que se han modificado para incorporar una mejora integral de la función de enlace de colágeno (Hall y otros, Human Gene Therapy, 8: 2183-2192,1997). El plásmido de expresión progenitor, pCAE (Morgan y otros, Journal of Virology, 67: 4712-4721,1967) fue suministrado por los USC Gene Therapy Laboratories. Este plásmido pCAE se modificó mediante la inserción de un punto Pst I (got gca gga, de codificación de los aminoácidos AAG) cerca del extremo N de la proteína madura entre las secuencias de codificación de los aminoácidos 6 y 7 (pCAEP). En este punto único Pst I se clonaron un oligonucleótido sintético dúplex (gga cat gta gga tgg aga gaa cca tca ttc atg got ctg tca got gca, que codifica los aminoácidos GHVGVREPSFMALSAA, un decapeptido mínimo de enlace de colágeno (en negrita) obtenido a partir del dominio derived D2 del factor bovino de von Willebrand Factor (Hall y otros, Human Gene Therapy, 11: 983-993,2000) flanqueado por enlazantes estratégicos (subrayado) para obtener pBv/CAEP.

25 [00135] La expresión de la proteína quimérica de envoltura en células productoras 293T está inducida por el promotor potente, es decir, CMV. La envoltura quimérica se procesa correctamente y se incorpora de forma estable en las partículas retrovirales, que exhiben un fenotipo de función de mejora sin una pérdida apreciable de la titulación infecciosa. La correcta orientación del dominio de enlace de colágeno fue confirmada por el análisis de la secuencia de ADN; y el control de calidad del plásmido fue confirmado mediante la digestión restrictiva de Pst I, que linealiza el plásmido y libera el dominio de enlace del colágeno.

35 [00136] El plásmido pCgpn contiene las secuencias de codificación MoMuLV gag-pol (Número de serie de GenBank 331934), obtenidas inicialmente a partir del clon proviral 3PO como pGag-pol-gpt, (Markowitz y otros, Journal of Virology, 62: 1120-1124,1988) y que presenta un borrado del par de base 134 de la señal de envoltura T y un truncado de las secuencias de codificación env. El constructo se facilitó como un fragmento EcoRI en pCgp, en el que el punto 5' EcoRI corresponde al punto XmaII antepuesto a Gag y el punto 3' EcoRI se añadió situándolo adyacente al punto Scal en env. El fragmento EcoRI se separó de pCgp y se ligó en el vector de expresión pcDNA3. 1+ (Invitrogen) en el único punto de clonación de EcoRI.

40 [00137] La orientación correcta se confirmó mediante la digestión de restricción con Sal I y el inserto se caracterizó adicionalmente por la digestión con EcoRI y HindIII. Las secuencias 5' y 3' del inserto gag-pol se confirmaron mediante un análisis de la secuencia de ADN utilizando el iniciador del emplazamiento de enlace del promotor T7 (S1) y el punto de iniciación inversa pcDNA3. 1/ BGH (AS1), respectivamente. El plásmido resultante, al que se denomina pCgpn, codifica la poliproteína gag-pol mediante el promotor CMV potente y un gen de resistencia a la neomicina promovido por el promotor temprano SV40. La presencia de un SV40 ori en este plásmido permite la replicación episomal en líneas celulares que expresan el antígeno grande T de SV40 (es decir, células productoras 293T).

50 [00138] A continuación se describe la construcción del plásmido que incluye el vector de expresión retroviral pdnGI/C- REX que contiene el constructo dominante negativo de ciclina GI (dnGI). El plásmido se mejora para la producción de vectores con una elevada titulación infecciosa mediante protocolos de transfección transitoria. Las secuencias cDNA (472-1098 más el codón de parada) que codifican aa 41 a 249 de la ciclina humana GI (CYCG1 Wu y otros, Oncology Reports, 1: 705-11, 1994; número de serie U47413) se generaron a partir de una plantilla de ciclina G1 de longitud completa mediante PCR, incorporando salientes Not I/Sal I. El constructo mutante de supresión del extremo N se clonó inicialmente en un vector de clonación TA (Invitrogen), a lo que siguió la digestión y el ligado de Not I/Sal I del inserto purificado para obtener un vector de expresión retroviral pGIXSvNa Not I/Sal I digerido (Genetic Therapy, Inc.) para obtener el vector pdnGI SvNa completo con secuencias de repetición de Terminal largo 5' y 3' (LTR) y una secuencia ψ de empaquetado retroviral.

55 [00139] Se preparó un CMV, es decir, promotor-optimizador, mediante PCR, a partir de una plantilla pIRES condicionada por CMV (Clontech) que incorporaba salientes Sac II, clonándose en el único punto Sac II de pdnGISvNa con anterioridad al 5' LTR. El gen de resistencia a la neomicina, que facilita la determinación de la titulación del vector, está condicionado por la Sv40 e. p. con su ori anidado. La inclusión del promotor potente CMV,

además del ori Sv40, facilita la producción de vectores retrovirales de alta titulación en células 293T que expresan el antígeno T largo (Soneoka y otros, Nucleic Acid Research, 23: 628-633, 1995). La orientación correcta y la secuencia del promotor CMV fue confirmada por la digestión restrictiva y el análisis de la secuencia del ADN, al igual que las secuencias de codificación dnGI. La identidad del plásmido y el control de calidad se confirman mediante digestión con Sac II (que libera el promotor 750 bp CMV) y Bgl II (que se corta en un único punto con el constructo dnGI).

Ejemplo 2: REXIN-G

[00140] El producto final, Mx-dnGI (REXIN-GTM), es un vector retroviral matricial (dirigido en el colágeno) que codifica un constructo de ciclina GI humana mutante con borrado del extremo N bajo el control de un promotor híbrido LTR/CMV. El vector también contiene el gen de resistencia a la neomicina que está condicionado por el promotor temprano SV40.

[00141] El vector Mx-dnGI se produce mediante co-transfección transitoria con 3 plásmidos de 293T (células embrionarias renales humanas 293 transformadas mediante el antígeno grande T de SV40) obtenidas a partir de un banco de células plenamente validado.

[00142] Los componentes del sistema de transfección incluyen el constructo plásmido terapéutico pdnGI/C-REX que contiene el mutante de borrado del gen de la ciclina GI humana que codifica a.a. 41 a 249 condicionado por el promotor temprano inmediato CMV, las secuencias de empaquetado y el gen de resistencia a la neomicina bacteriana bajo el control de un promotor interno temprano SV40. El gen truncado de la ciclina GI se clonó inicialmente en un vector de clonación TA (Invitrogen), seguido de una digestión Not I/Sal I y de ligado del inserto purificado en un vector de expresión retroviral pGIXSvNa digerido por Not I/Sal I (proporcionado por Genetic Therapy, Inc., Gaithersburg, MD) para obtener el vector pdnGI SvNa completo con las secuencias 5' y 3' LTR y una secuencia T. El CMV, es decir, el promotor-optimizador se preparó mediante PCR a partir de una plantilla pIRES condicionada por CMV (Clontech), que incorporaba salientes Sac II, clonándose en el único punto SacII de pdnGISvNa con anterioridad al 5' LTR.

[00143] El sistema también incluye el plásmido de envoltura Mx (Bvl/pCAEP) que contiene una proteína anfotrópica modificada 4070A condicionada por CMV en la que se insertó un péptido de enlace de colágeno en un punto Pst I modificado por ingeniería, entre a. a. 6 y 7 de la región del extremo N de la envoltura 4070A.

[00144] El sistema también incluye el plásmido pCgpn que contiene los elementos MLV gag-pol condicionados por el promotor temprano inmediato CMV. Se obtiene a partir del clon 3PO como pGag-pol-gpt. El esqueleto del vector es un pcDNA3.1+ de Invitrogen. La señal de poliadenilación y las secuencias de terminación de la transcripción procedentes de la hormona del crecimiento bovino mejoran la estabilidad del ARN. Se incluye un SV40 ori junto con el e. p. para la replicación episomal y el rescate del vector en líneas celulares que expresan el antígeno T dirigido SV40.

[00145] Se han analizado los plásmidos mediante digestión restrictiva de endonucleasa, y la línea celular consiste en una base DMEM complementada con 4 gramos por litro de glucosa, 3 gramos por litro de bicarbonato sódico, y suero bovino fetal sometido a tratamiento con rayos gamma del 10% (Biowhittaker). El suero se obtuvo de fuentes estadounidenses, y se ha comprobado que está libre de virus bovinos, de acuerdo con los reglamentos de la USDA. La gemación de las partículas retrovirales mejora mediante inducción con butirato sódico. Las partículas virales resultantes se procesan exclusivamente haciendo pasar los sobrenadantes a través de un filtro de 0,45 micras o concentrándolos mediante un método de flujo/diafiltrado tangencial. Las partículas virales, aparentemente, son un retrovirus Tipo C. Las partículas retrovirales se recolectarán y suspenderán en una solución de un medio DMEM al 95% y albúmina de suero humano al 1,2%. Esta formulación se almacena en partes alícuotas de 150 ml en una criobolsa de 500 ml y se mantiene congelada entre -70° y -86° C hasta su utilización.

[00146] La preparación del vector Mx-dnGI para su administración al paciente consiste en la descongelación del vector en la bolsa del vector, en un baño de etanol al 80% a 37° C. Cada bolsa del vector se descongelará durante una hora antes de su infusión al paciente, se tratará con Pulmozyme (10 U/ml), y se infundirá inmediatamente durante 1-3 horas.

Ejemplo 3: Eficacia terapéutica del vector Mx-dnGI

[00147] Se comprobó la eficacia del Mx-dnGI para inhibir la proliferación de células cancerígenas in vitro, así como para detener el crecimiento tumoral in vivo de metástasis de hígado en un modelo en ratón desnudo. Se seleccionó como prototipo de cáncer metastático una línea celular cancerígena humana indiferenciada de origen pancreático. La eficiencia de la transducción retroviral en estas células cancerígenas resultó excelente, variando entre un 26% y un 85%, en función de la multiplicidad de la infección (4 y 250 respectivamente). Para la selección de un gen terapéutico, se llevaron a cabo estudios de proliferación celular en células transducidas, utilizando vectores que incorporaban diversos constructos de ciclina GI. En condiciones estándar, el vector Mx-dnGI mostró en todo momento el mayor efecto antiproliferación, concomitante con el aspecto de la ciclina GI inmunoreactiva en la región de 20 kDa, que representa la proteína dnGI. En función de estos resultados, se seleccionó el vector Mx-dnGI para los posteriores estudios de eficacia in vivo.

[00148] Para evaluar el comportamiento de Mx-dnGI in vivo, se estableció un modelo de metástasis hepática en ratón desnudo mediante la infusión de 7×10^5 células pancreáticas humanas en la vena portal, a través de un catéter de drenaje que se mantuvo durante 14 días. Las infusiones del vector se iniciaron al cabo de tres días, y consistieron en 200 ml/día de Mx-dnGI (REXIN-GTM; titulación: 9.5×10^8 cfu/ml) o solución salina de control PBS durante un total de 9 días. Los ratones se sacrificaron un día después de la finalización de las infusiones del vector.

[00149] Se llevó a cabo la evaluación histológica e inmunocitoquímica de los focos tumorales con metástasis procedentes de ratones tratados con PBS o una baja dosis de Mx-dnGI, evaluándose con un sistema óptico Optimas. La proteína de la ciclina GI humana estaba muy expresada en los focos tumorales metastáticos, como lo demostró la mayor inmunoreactividad nuclear de la ciclina GI (material de tinción marrón) en los animales tratados con PBS, y los focos tumorales residuales de los animales tratados con el vector Mx-dnGI. El examen histológico de secciones del hígado de los animales de control revelaron importantes focos tumorales con áreas de angiogénesis y formación de estroma; los componentes epiteliales mostraron una tinción positiva para la citoqueratina y las células tumorales asociadas estromales/endoteliales mostraron una tinción positiva a la vimentina y al receptor FLK. Por el contrario, el tamaño medio de los focos tumorales en los animales tratados con una baja dosis de Mx-dnGI se redujo de forma importante en comparación con los controles efectuados con PBS ($p = 0,001$), revelando simultáneamente un aumento focal en la densidad de núcleos apoptóticos en comparación con el grupo de control PBS. Adicionalmente, la infiltración mediante PAS +, CD68+ y macrófagos cargados con hemosiderina se observó en los focos tumorales residuales de los animales tratados con Mx-dnGI, lo que sugiere una eliminación activa de las células tumorales degenerativas y de los restos tumorales por parte del sistema retículo-endotelial hepático. En su conjunto, estos resultados demuestran la eficacia antitumoral in vivo de un vector retroviral dirigido inyectable que incluye un gen de control del ciclo celular citocídico, y representan un avance definitivo en el desarrollo de vectores dirigidos inyectables para el cáncer metastático.

[00150] En un modelo de cáncer pancreático humano subcutáneo con ratones desnudos, hemos demostrado que la infusión intravenosa (IV) de Mx-dnGI optimizaba la administración de los genes y detenía el crecimiento de los tumores subcutáneos, en comparación con el vector no dirigido CAE-dnGI ($p = 0,014$), un vector dirigido matricial de control que incorpora un gen marcador (Mx-nBg; $p = .004$) y una solución de control PBS ($p = .001$). La mejor penetración del vector y la transducción de los nódulos tumorales ($35,7 \pm S. D. 1,4\%$) están correlacionadas con la eficacia terapéutica sin la toxicidad sistémica asociada. También se llevaron a cabo estudios de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones tratados con un placebo PBS, con el vector no dirigido CAE-dnGI y con el vector Mx-dnGI. Utilizando el test logrank de Tarone, el valor global de p para la comparación de los tres grupos simultáneamente fue 0.003, mostrando una significativa tendencia a un nivel de 0,004, lo que indica que la probabilidad de un control a largo plazo del crecimiento tumoral es significativamente mayor con el vector dirigido Mx-dnGI que con el vector no dirigido CAE-dnGI o el placebo PBS. En su conjunto, el presente estudio demuestra que el Mx-dnGI, administrado mediante inyección en una vena periférica (i) y acumulado en la vasculatura tumoral angiogénica durante una hora, (ii) transducía las células tumorales con una gran eficacia (iii) se conseguía un mayor aporte del gen terapéutico y una mayor eficacia a largo plazo sin provocar una toxicidad apreciable.

Ejemplo 4: Estudios farmacológicos/toxicológicos

[00151] Se ha demostrado que los vectores retrovirales inyectables matriciales dirigidos que incorporan péptidos que dirigen los componentes matriciales extracelulares (por ejemplo, el colágeno) mejoran el aporte de genes terapéuticos in vivo. Se presentan datos adicionales utilizando dos modelos murinos de cáncer y dos vectores retrovirales de dirección matricial basados en MLV y que incorporan un constructo de ciclina GI dominante negativa citocídica /citostática (designado como Mx-dnGI y MxV-dnGI). Tanto Mx-dnGI como MxV-dnGI son vectores retrovirales anfotrópicos 4070A basados en MLV que exhiben un patrón de dirección matricial (colágeno) para la dirección de las áreas de patología. La única diferencia entre ambos vectores es que el MxV-dnGI es un pseudotipo con una proteína G del virus de la estomatitis vesicular.

[00152] En el modelo de xenoinjerto de cáncer humano subcutáneo, se implantaron subcutáneamente 1×10^7 células cancerígenas pancreáticas humanas MiaPaca2 (prototipo del cáncer gastrointestinal metastático) en los costados de ratones desnudos. Seis días más tarde, se inyectaron diariamente 200 μ l del vector Mx-dnGI directamente en la vena de la cola durante uno o dos ciclos de tratamiento de 10 días. (dosis total del vector: $5,6 \times 10^7$ [n=6] o $1,6 \times 10^8$ cfu [n=4] respectivamente). En el modelo de metástasis hepática en ratón desnudo se inyectaron 7×10^5 células MiaPaca2 a través de la vena portal, mediante un catéter permanente que se mantuvo colocado entre 10 y 14 días. Se infundieron 200 ml diarios del vector MxV-dnGI durante 10 min y durante 6 o 9 días (dosis total del vector: $4,8 \times 10^6$ [n=3] o dosis cfu $1,1 \times 10^9$ [n=4] respectivamente) comenzando tres días después de la infusión de las células tumorales. Para los estudios de biodistribución, se desarrolló un ensayo TaqMan™ para detectar el vector basado en GIXSvNa que contiene las secuencias genéticas SV40 y Neomicina (Neo) en el trasfondo del ADN genómico del ratón (Althea Technologies, San Diego, CA, USA). El ensayo detecta un amplicón de 95 nts. 1779-1874 del vector del plásmido GIXSvNa) en el cual la sonda con la etiqueta fluorescente solapa la porción 3' del gen SV40 y la porción 5' del gen de resistencia a la neomicina fosfotransferasa (Neor).

[00153] No se observó mortalidad ni morbilidad relacionada con el vector en el caso del vector Mx-dnGI o del MxV-dnGI. Se detectaron señales positivas de bajo nivel en el hígado, pulmones y bazo de los animales tratados con dosis bajas y dosis altas del vector. No se detectaron señales de PCR en los testículos, el cerebro o el corazón de

los animales tratados con el vector. El examen histopatológico reveló flebitis de la vena portal, pielonefritis, miocarditis focal, en dos animales con catéteres permanentes y sin profilaxis mediante antibióticos. No se observaron otras patologías en órganos no dirigidos de los ratones tratados con Mx-dnGI- o MxV-dnGI-. Los perfiles de la química del suero revelaron elevaciones suaves de ALT y AST en los animales tratados con Mx-dnGI- en comparación con los controles con PBS. No obstante, los niveles se mantuvieron dentro de los límites normales en los ratones. No se detectaron anticuerpos de neutralización del vector en el suero de los animales tratados con el vector durante un período de seguimiento de 7 semanas.

[00154] Los resultados preclínicos indicados anteriormente confirman que la infusión intravenosa de Mx- dnGI en dos modelos de cáncer pancreático humano en ratones desnudos no arrojó daños apreciables a los tejidos normales adyacentes, ni efectos secundarios sistémicos. El método de la aportación dirigida de genes mediante infusión intravenosa ofrece una serie de importantes ventajas clínicas. La infusión en el sistema venoso permitirá el tratamiento del tumor y el de los focos tumorales ocultos. Se cree que la mayor proporción mitótica observada en la división de células tumorales tendrá como consecuencia una mayor eficacia de la transducción en tumores, reservando los hepatocitos y otros tejidos normales. Por lo tanto, proponemos un protocolo de investigación clínica humana utilizando un vector de Mx-dnGI de administración intravenosa para el tratamiento de cánceres de páncreas localmente avanzados o metastáticos, así como otros tumores sólidos refractarios a la quimioterapia estándar.

Ejemplo 5: Informes clínicos

[00155] Los objetivos del estudio consistieron (1) en determinar la toxicidad limitadora de la dosis y la dosis máxima tolerada (de seguridad) de sucesivas infusiones intravenosas de Rexin-G, y (2) evaluar las posibles respuestas antitumorales. El protocolo se diseñó para pacientes de cáncer en fase terminal con un período estimado de supervivencia de al menos 3 meses. Tres pacientes con cáncer de páncreas de fase IV a los que sus oncólogos consideraban refractarios a la quimioterapia estándar fueron invitados a participar en el protocolo de utilización paliativa utilizando Rexin-G aprobado por la Philippine Bureau of Food and Drugs. Se aplicó diariamente un régimen de aumento de la dosis intrapaciente mediante infusión intravenosa de Rexin-G durante 8-10 días. Cuando finalizó este régimen fue seguido por un período de evaluación de una semana para comprobar la toxicidad limitadora de la dosis; tras lo cual, se administró la dosis máxima tolerada de Rexin-G durante otros 8-10 días. Si el paciente no desarrollaba un evento adverso de grado 3 o 4 relacionado con el Rexin-G durante el período de observación, la dosis de Rexin-G se aumentaba como se muestra en la tabla 1 anterior.

[00156] Se evaluó la respuesta tumoral mediante determinaciones en serie del volumen del tumor utilizando la fórmula anchura² x longitud x 0.52 medido mediante calibres o por imagen radiológica (Resonancia magnética o TAC).

[00157] A la paciente N° 1, una mujer filipina de 47 años, se le había diagnosticado, mediante examen histológico de una biopsia del tejido tumoral y estudios de fase, un adenocarcinoma localizado de la cabeza del páncreas. Se sometió a un procedimiento quirúrgico de Whipples, que incluyó la resección completa del tumor primario. A ello le siguió un tratamiento semanal de gemcitabine durante 7 dosis, pero se interrumpió la quimioterapia debido a su inaceptable toxicidad. Unos meses más tarde, una resonancia magnética de seguimiento mostró la recurrencia del tumor primario, con extensión metastática a los ganglios linfáticos supraclaviculares y abdominales. En cumplimiento del protocolo clínico, la paciente recibió dos ciclos de tratamiento de 10 días a base de Rexin-G para obtener una dosis acumulada de 2.1 x 10^{e11} unidades a lo largo de 28 días, con un período interino de descanso de una semana. En ausencia de toxicidad sistémica, la paciente se sometió a un ciclo de tratamiento adicional de 10 días con una dosis total acumulada de 3x10^{e11} Unidades.

[00158] Se midieron manualmente las dimensiones de dos ganglios linfáticos supraclaviculares superficiales utilizando calibres. Se observó una disminución gradual en el volumen tumoral de los ganglios linfáticos supraclaviculares, que llegaban a unas reducciones del 33% y del 62% en el tamaño del tumor, respectivamente, al final del ciclo de tratamiento N° 2, el día 28 (tabla 2).

[00159] Tabla 2: Calibrado de los ganglios linfáticos supraclaviculares del paciente N° 1.

| Fecha | Medida con calibre (cm) | Volumen tumoral* cm ³ | % reducción del tamaño desde el inicio de la administración de Rexin-G Rx |
|--------|-------------------------|----------------------------------|---|
| Día 1 | LN1 1,9 X 2,1 | 3,9 | |
| | LN2 1,5 x 1,8 | 2,1 | |
| Día 26 | LN1 1,8 X 1,8 | 3,0 | 23 |

| | | | |
|--------|-----------------|-----|----|
| | LN2 1,3 x 1,3 | 1,1 | 48 |
| Día 27 | LN1 1,7 X 1,7 | 2,6 | 33 |
| | LN2 1,15 x 1,15 | 0,8 | 62 |

[00160] Una resonancia magnética de seguimiento reveló (i) la inexistencia de nuevas áreas de metástasis tumoral, (ii) áreas discernibles de necrosis central, que afectaban a un 40-50% del tumor primario, y (iii) una importante reducción del tamaño del ganglio linfático abdominal para-aórtico (figuras 1A-B). El día 54, una resonancia de seguimiento no mostró cambios de intervalo en el tamaño del tumor primario. En línea con estos resultados, se observó un descenso gradual en los niveles de suero CA19-9 (partiendo de un máximo de 1200 a un mínimo de 584 U/ml), lo que supuso una reducción del 50% en los niveles de CA19-9 EL DÍA 54 (Figura 1C). No obstante, un TAC de seguimiento realizado el día 101 mostró un aumento significativo del tamaño del tumor primario y de los ganglios linfáticos supraclaviculares. La paciente se negó a someterse a quimioterapia hasta el día 175, cuando aceptó recibir gemcitabine semanalmente, 1000 mg/m². De acuerdo con los criterios de RECIST, la paciente N° 1 está viva con una enfermedad progresiva en el seguimiento del día 189, 6,75 meses después del inicio de las infusiones de REXIN-G, 11 meses después de la recurrencia del tumor, y 20 meses desde el momento del diagnóstico inicial.

[00161] A la paciente N° 2, una mujer filipina de 56 años, se le diagnosticó un carcinoma de fase IV A localmente avanzado y no resecable en la cabeza del páncreas, mediante un examen citológico de un raspado biliar. Una laparotomía exploratoria reveló que el tumor rodeaba la vena portal e invadía las cercanías de la arteria y la vena mesentérica superior. Había recibido radioterapia externa con 5 fluoruracil, y también se le administraron 8 dosis semanales de gemcitabine, seguido de dosis semanales de mantenimiento. No obstante, se observó un aumento progresivo en los niveles de suero CA19-9, y un TAC de seguimiento reveló que el tumor había aumentado de tamaño (figura 2A). La paciente se sometió a dos ciclos de tratamiento con REXIN-G como infusiones intravenosas diarias para una dosis total acumulada de $1,8 \times 10^{11}$ unidades. Resultados: Los TACs abdominales revelaron un descenso significativo del volumen del tumor, que pasó de 6,0 cm³ al comienzo de las infusiones de REXIN-G a 3,2 cm³ al final del tratamiento, lo que supuso un descenso del 47% en el tamaño del tumor el día 28 (figura 2A-C). El TAC de seguimiento realizado el día 103 no mostró cambios en el intervalo del tamaño del tumor, tras lo cual la paciente se mantuvo con gemcitabine mensual. De acuerdo con los criterios de RECIST, la paciente N° 2 está viva, asintomática, con una enfermedad estable en el seguimiento del día 154, 5,5 meses después del inicio de las infusiones de REXIN-G y 14 meses desde el momento del diagnóstico inicial.

[00162] Al paciente N° 3, un varón chino diabético de 47 años de edad se le diagnosticó un adenocarcinoma de fase IVB en el cuerpo y la cola del páncreas, con numerosas metástasis de hígado y ganglio linfático portal, confirmado mediante biopsia guiada de hígado. Teniendo en cuenta al rápido desenlace fatal del adenocarcinoma de páncreas de fase IVB, se invitó al paciente a participar en un segundo protocolo clínico utilizando REXIN-G, seguido de la administración semanal de gemcitabine. Se administró una dosis inicial de REXIN-G para sensibilizar el tumor a la quimioterapia con gemcitabine, para conseguir una mayor eficacia citocídica. El paciente recibió diariamente infusiones intravenosas de REXIN-G a una dosis de $4,5 \times 10^9$ Unidades/dosis durante 6 días, para una dosis total acumulada de $2,7 \times 10^{10}$ unidades, seguido de 8 dosis semanales de gemcitabine (1000 mg/m²). El día 62, el TAC abdominal de seguimiento mostró que se había reducido el tamaño del tumor primario, pasando de 7,0 x 4,2 cm (Volumen del tumor: 64,2 cm³), medida de referencia, a 6,0 x 3,8 cm (Volumen del tumor: 45 cm³) (figura 3A). Asimismo, se produjo una importante reducción en el número de nódulos hepáticos pasando de 18 nódulos (referencia) a 5 nódulos (figura 3C), con regresión del nódulo hepático de mayor tamaño, que pasó de un valor de referencia de 2,2 x 2 cm (Volumen del tumor: 4,6 cm³) a 1 x 1 cm (Volumen del tumor: 0,52 cm³) el día 62 (figura 3B). De acuerdo con los criterios de RECIST, el paciente N° 3 está vivo, con una enfermedad estable, en el seguimiento del día 133, 4,7 meses después del inicio de las infusiones de REXIN-G y a los 5 meses del momento del diagnóstico.

[00163] La tabla 3 muestra la evaluación comparativa de las respuestas globales de los tumores en los tres pacientes. Utilizando los criterios de RECIST, REXIN-G indujo la estabilización del crecimiento tumoral en los tres pacientes.

[00164] Tabla 3: Evaluación de las respuestas globales tumorales de acuerdo con RECIST

| Paciente N° | 1 | 2 | 3 |
|--------------------------|---|---------------------------------------|---------|
| Estadio de la enfermedad | IVB Recurrente | IVA | IVB |
| Tratamiento previo | Procedimiento de Whipples Radioterapia externa | Radioterapia externa 5 fluoruracil | Ninguno |

| | Gemcitabine | Gemcitabine | |
|---|--|---|---|
| Puntuación de Karnofsky antes del tratamiento | 0 | 0 | 0 |
| Tratamiento y dosis | Rexin-G IV (3,0 x 10e11 U) | Rexin-G IV (1,8 x 10e11 U) | Rexin-G IV (2,7 x 10e10 U) Gemcitabine IV [1000 mg/m ² x 8] |
| Respuesta | Estabilización del crecimiento del tumor | Estabilización del crecimiento del tumor | Estabilización del crecimiento del tumor |
| Estado de supervivencia | Viva, con enfermedad progresiva a los 20 meses del diagnóstico | Viva, con enfermedad estable a los 14 meses del diagnóstico | Vivo, con enfermedad estable a los 5 meses del diagnóstico |

5 **[00165]** En este estudio se han utilizado dos métodos para evaluar las respuestas tumorales a las infusiones intravenosas de Rexin-G. Utilizando el criterio NCI-RECIST, que mide la suma de los diámetros mayores de las lesiones dirigidas que son superiores a 2 cm, y la desaparición frente a persistencia de todas las lesiones no dirigidas como puntos de comparación, en los 3 de 3 (100%) pacientes tratados con Rexin-C se había estabilizado el crecimiento del tumor durante más de 100 días (3 meses) (tabla 3). La evaluación de la respuesta mediante la medida del volumen tumoral (fórmula: anchura² x longitud x 0,52) (16) reveló que se había producido una regresión del tumor inducida por Rexin-G en 3 de 3 (100%) pacientes, es decir, una regresión del 33-62% de la linfadenopatía metastática en la paciente nº 1 (tabla 2), una regresión del 47% del tumor primario en la paciente Nº 2 (figura 2C) y una regresión del 30% del tumor primario, una erradicación del 72% (13/18) de los focos hepáticos con metástasis y una regresión del 89% de un ganglio portal metastático en el paciente Nº 3, documentado mediante estudios por imagen (resonancia magnética o TAC) y mediciones con calibre (figura 3). Además, la evaluación de la seguridad demostró que la toxicidad limitadora de la dosis no se producía hasta una dosis acumulada del vector de 3 x 10¹¹ unidades, lo que indica que puede administrarse una mayor cantidad de vector para conseguir una mayor eficacia terapéutica. Las infusiones del vector Rexin-G no se asociaron a náuseas o vómitos, diarrea, neuropatía, pérdida de pelo, inestabilidad hemodinámica, supresión de médula ósea, daños hepáticos o renales.

20 **[00166]** La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran al alcance de cualquier persona versada en la materia. Dichas técnicas se describen en la literatura. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis y otros, Patente Estadounidense Nº 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu y otros eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986);
30 Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N. Y., 1986).

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un vector de administración dirigida que comprende partículas retrovirales para inhibir la metástasis tumoral, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

A) transfección transitoria de una célula productora con:

- 5 i) un primer plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína anfotrópica de envoltura 4070A modificada para contener un dominio de enlace de colágeno, en el que la secuencia de ácido nucleico está enlazada operativamente a un promotor, y en el que el dominio de enlace de colágeno comprende la secuencia de aminoácido Gly-His-Val-Gly-Trp-Arg-Glu-Pro-Ser-Phe Met-Ala-Leu-Ser-Ala-Ala obtenida a partir del dominio D2 del factor de von Willebrand;
- 10 ii) un segundo plásmido, que comprende:
- (a) una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido retroviral gag-pol,
- (b) una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido que confiere resistencia a medicamentos a la célula productora,
- 15 (c) un origen de SV40 de replicación;
- iii) un tercer plásmido, que comprende:
- (a) una secuencia heteróloga de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido de diagnóstico o terapéutico,
- (b) secuencias de repetición terminal larga 5' y 3' (LTRs),
- 20 (c) una secuencia de empaquetado retroviral ψ ,
- (d) un promotor CMV antepuesto a la LTR 5',
- (e) una secuencia de ácido nucleico enlazada operativamente a un promotor, y en el que la secuencia codifica un polipéptido que confiere resistencia a medicamentos a la célula productora,
- 25 (f) un origen de SV40 de replicación, en el que la célula productora es una célula humana que expresa un antígeno grande T de SV40;
- B) cultivar las células productoras según A) en condiciones que permitan la producción de vectores de administración dirigida y su liberación en los sobrenadantes del cultivo;
- (C) aislar e introducir los sobrenadantes en un sistema de colector de bucle cerrado que comprende una bolsa tipo flexboy® y un sistema de colector, en el que la bolsa tipo flexboy está formada por una película coextrusionada de tres capas que consta de una capa de contacto con el fluido fabricada con etil vinil acetato, una barrera al gas de Etilen vinil alcohol y una capa exterior de etil vinil acetato para la recolección de las partículas virales;
- 30 (D) recogida y concentración de los vectores de administración dirigidos, y
- (E) tratamiento de dichos vectores de administración dirigidos con un agente de degradación del ADN que no provoque una pérdida de la potencia del vector.
- 35 2. Método de la reivindicación 1, en el que el dominio de enlace del colágeno está contenido en la porción gp70 de la proteína envolvente anfotrópica 4070A.
3. Método de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido terapéutico es un mutante de supresión del extremo N de la ciclina G1.
4. Método de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido terapéutico es interleucina-2 (IL-2).
- 40 5. Método de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido terapéutico es el factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF).
6. Método de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido terapéutico es la timidina quinasa.
7. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer plásmido es el plásmido Bvl/pCAEP mostrado en la Figura 12A.

8. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo plásmido es el plásmido pCgpn mostrado en la Figura 13A.

9. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tercer plásmido se obtiene a partir del plásmido GIXSvNa mostrado en la Figura 10A.

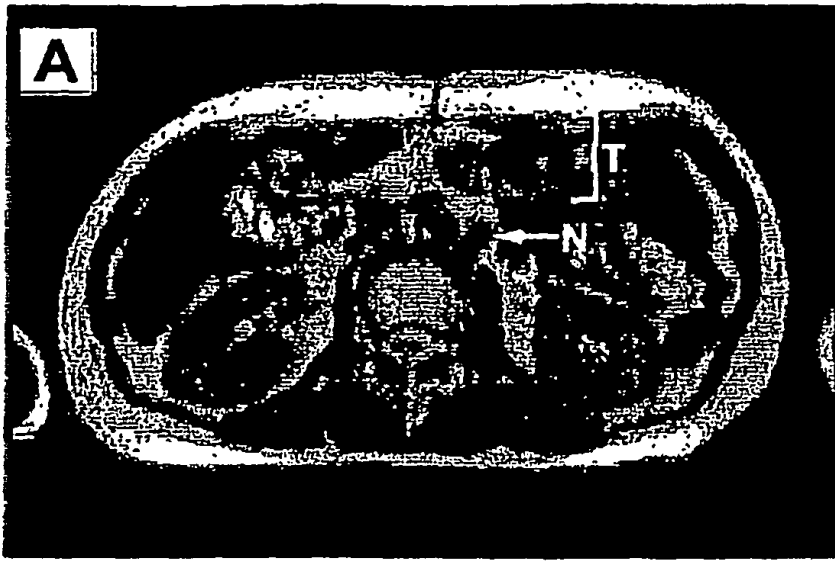


FIG. 1A

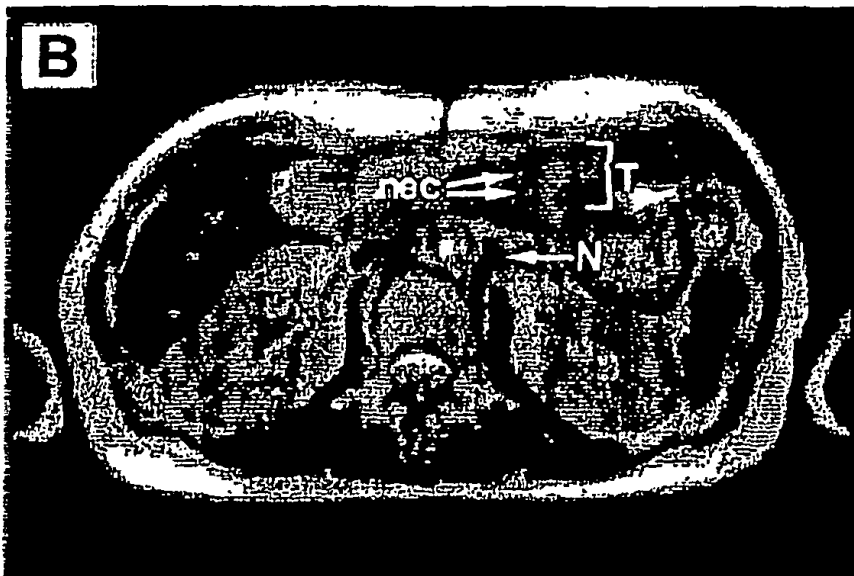


FIG. 1B

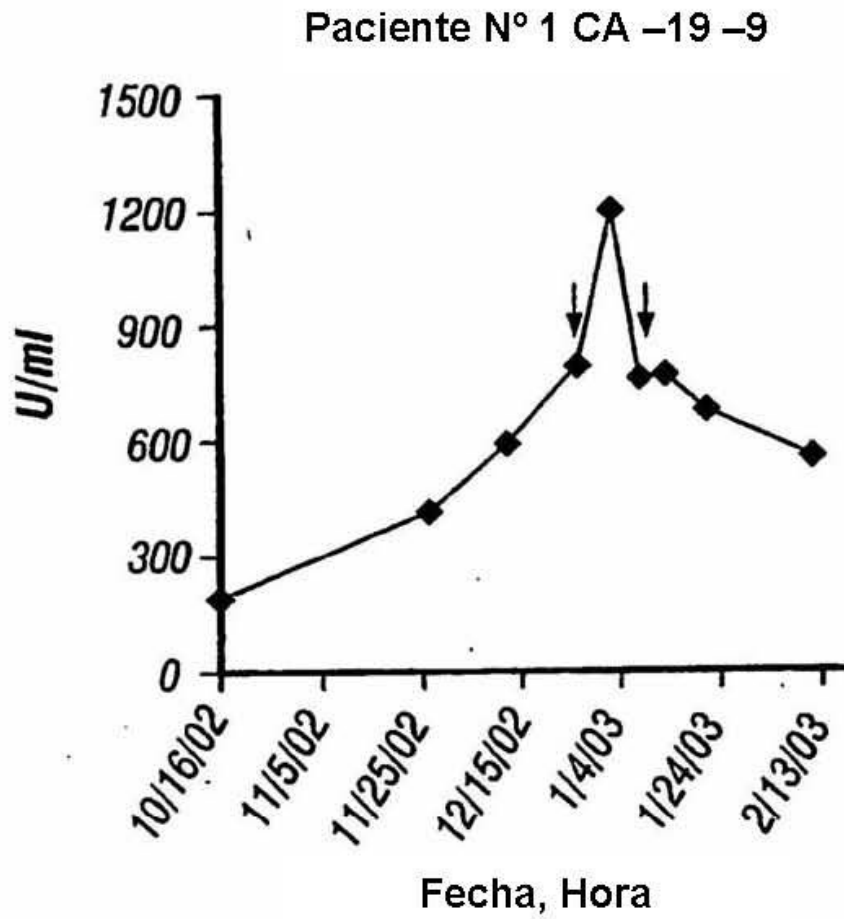


FIG. 1C

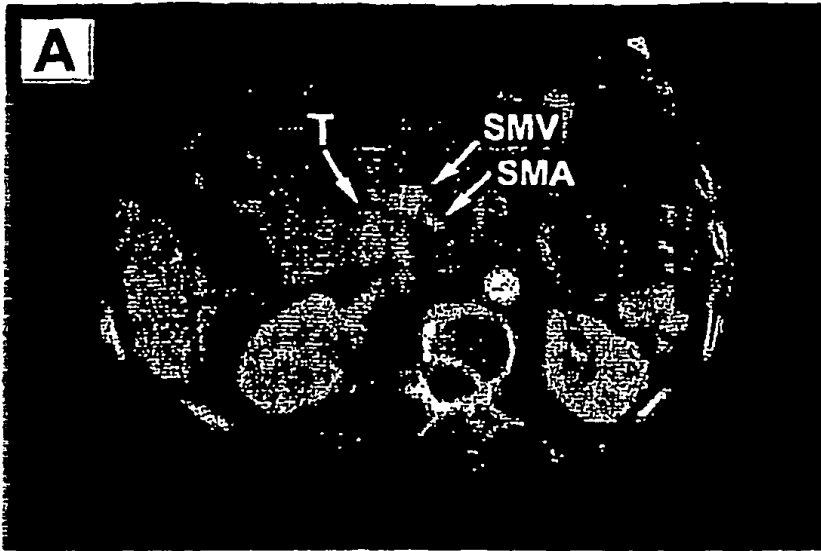


FIG. 2A

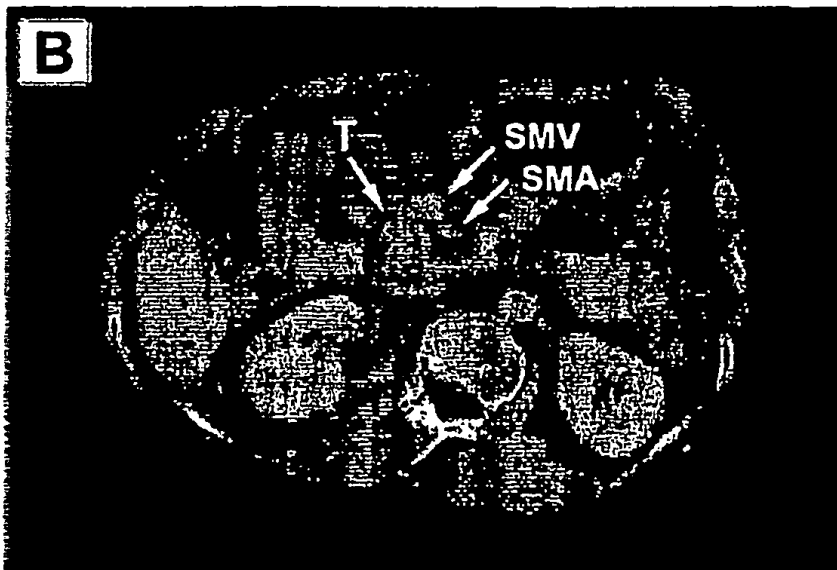
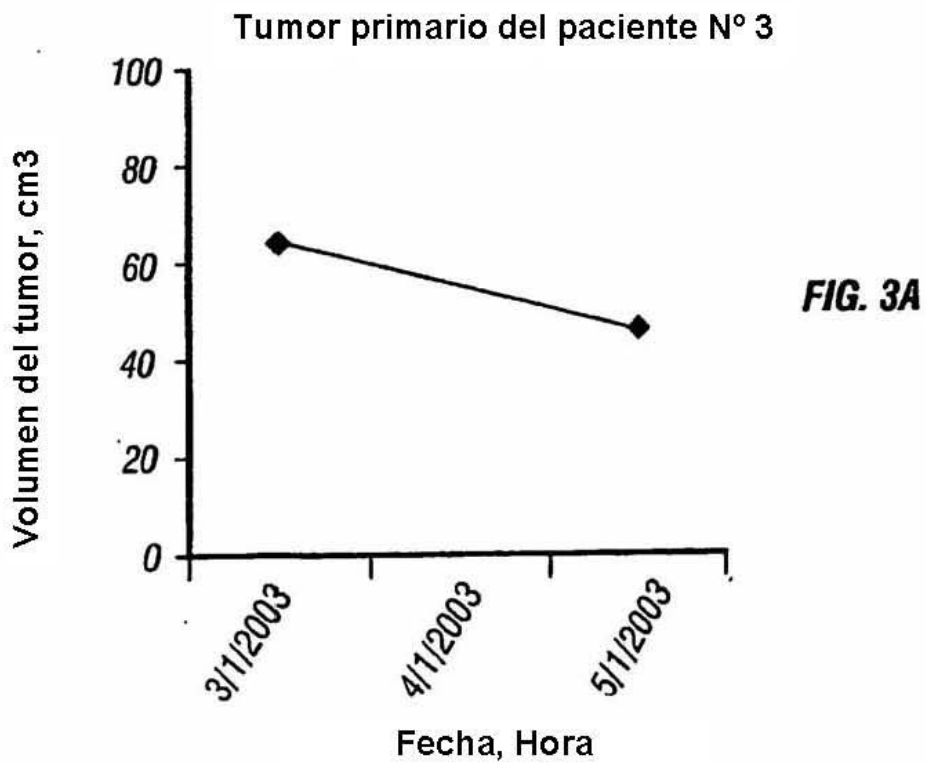
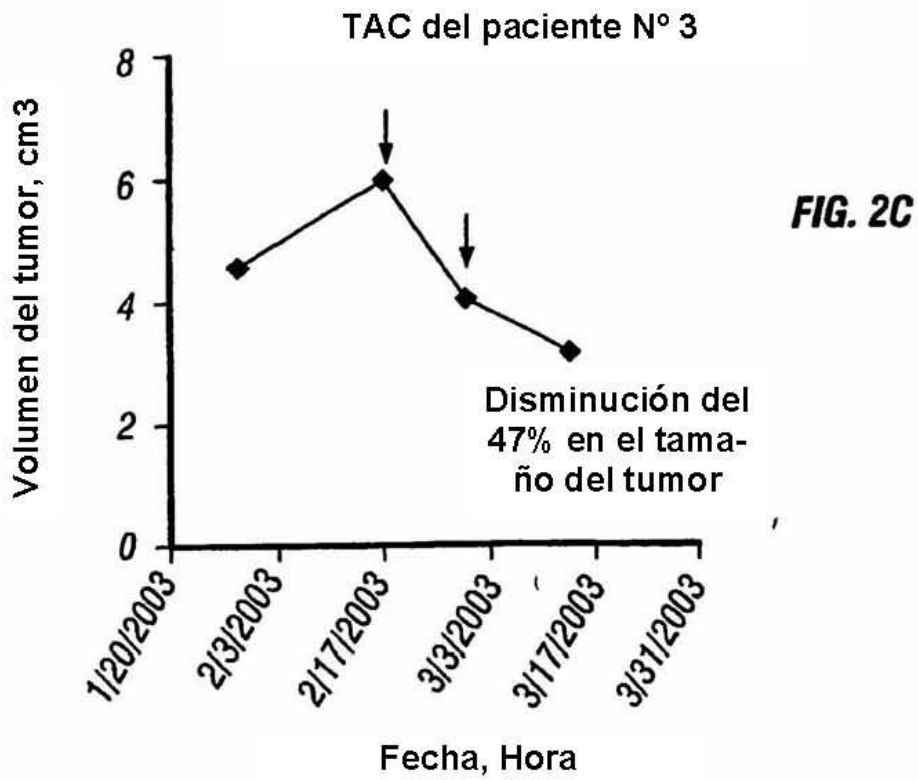
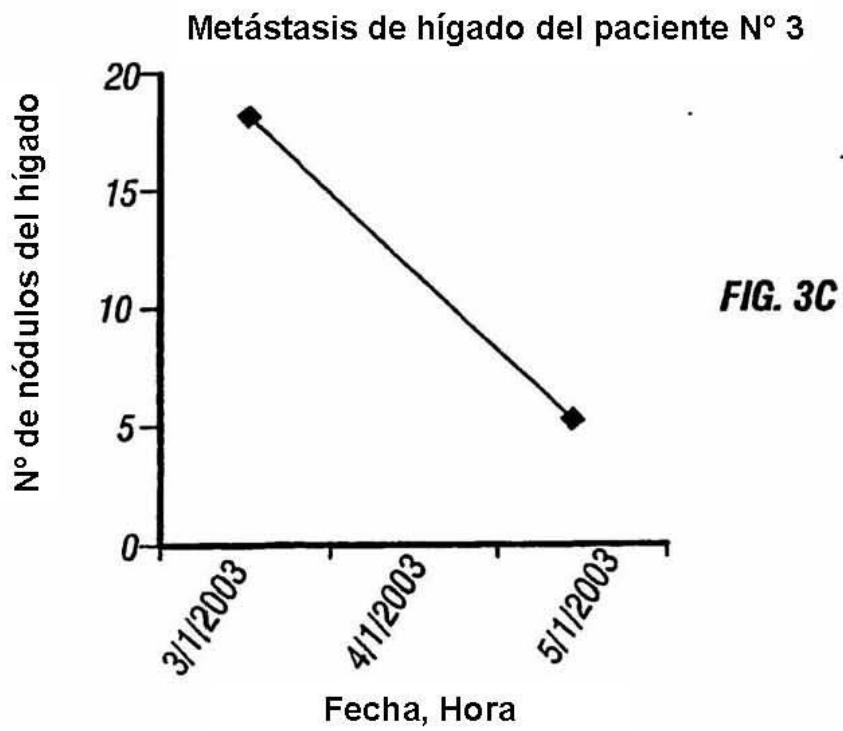
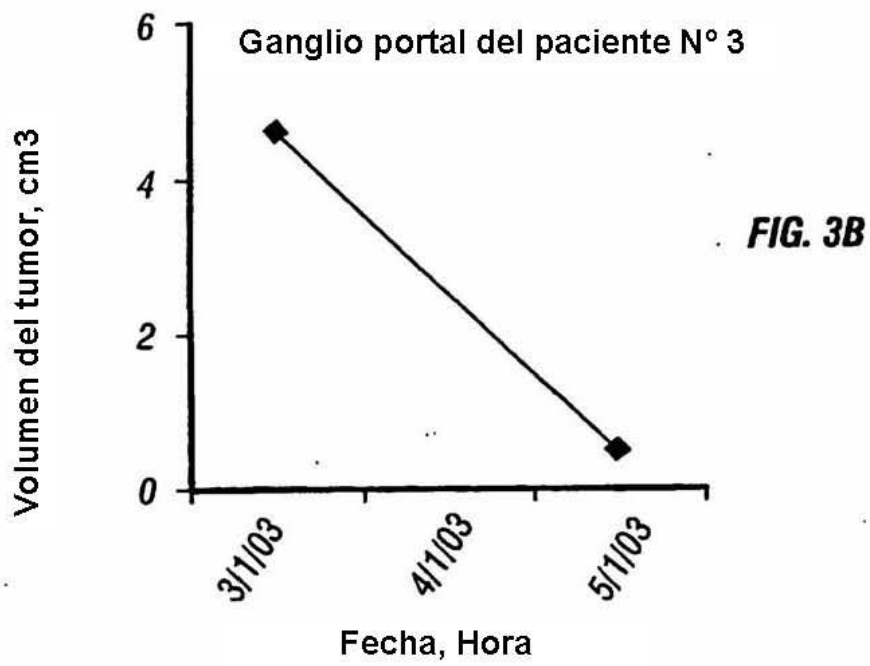
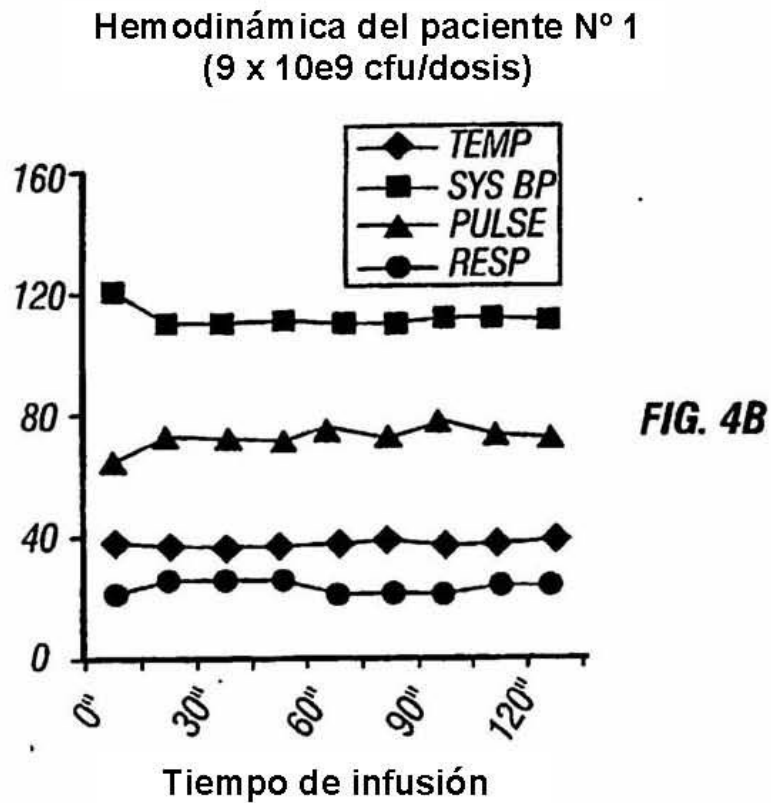
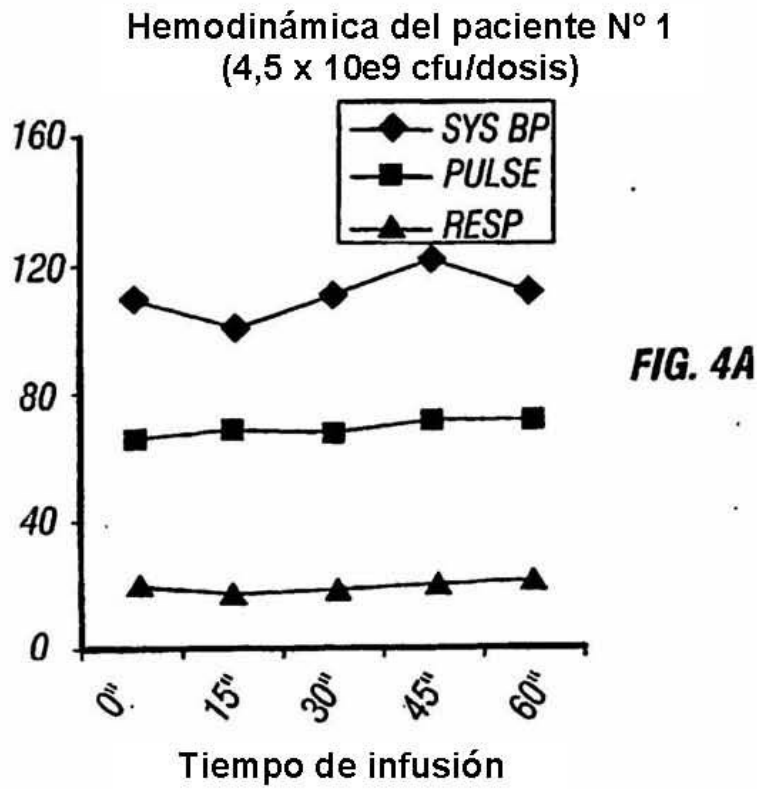


FIG. 2B







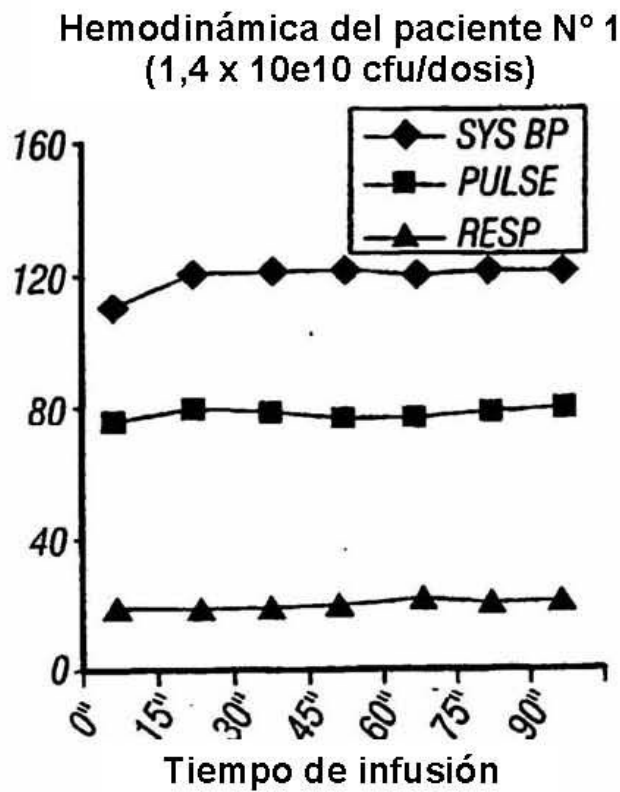


FIG. 4C

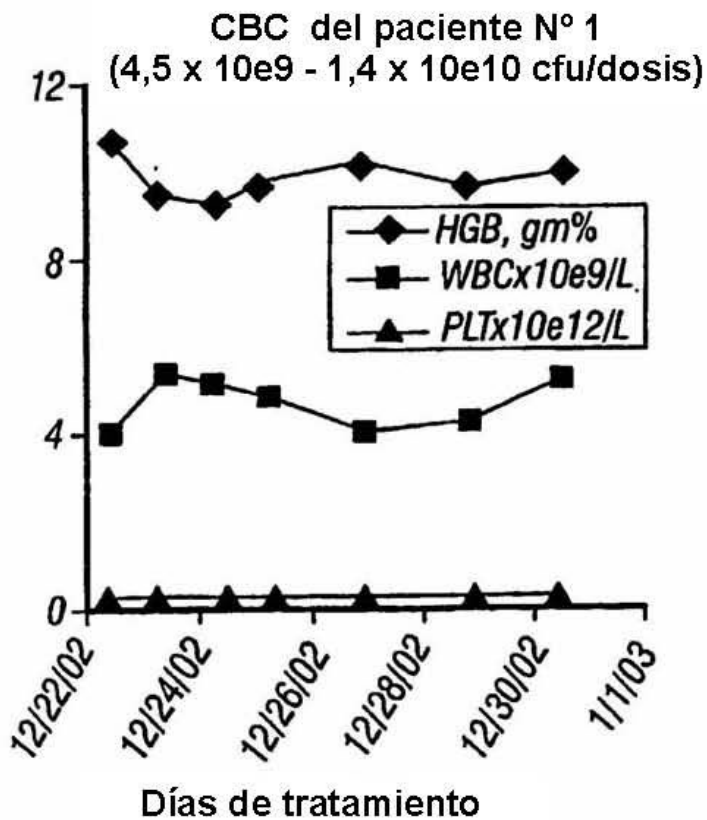
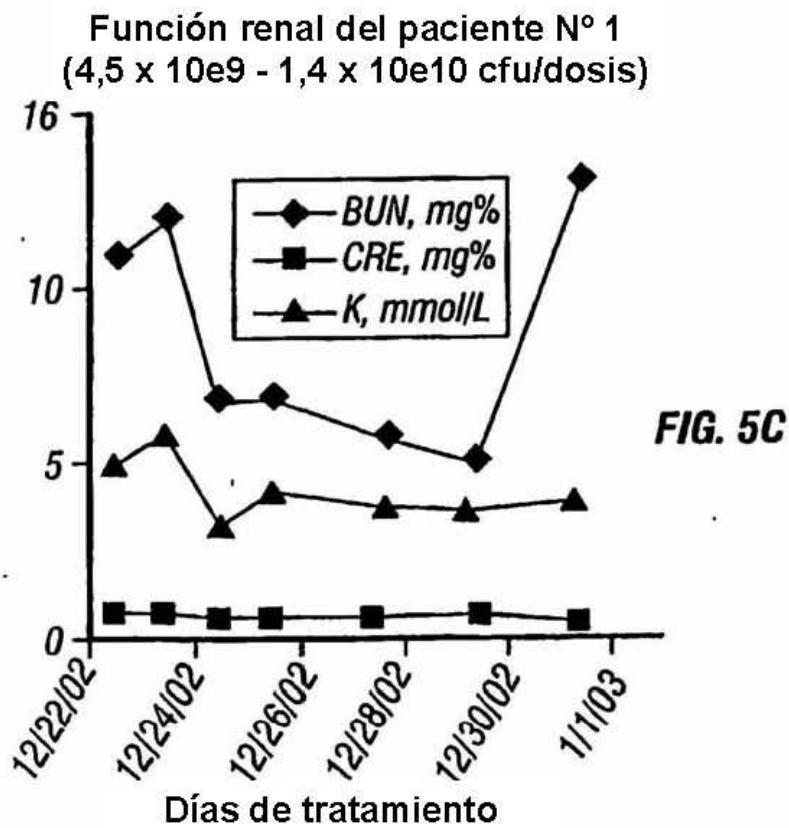
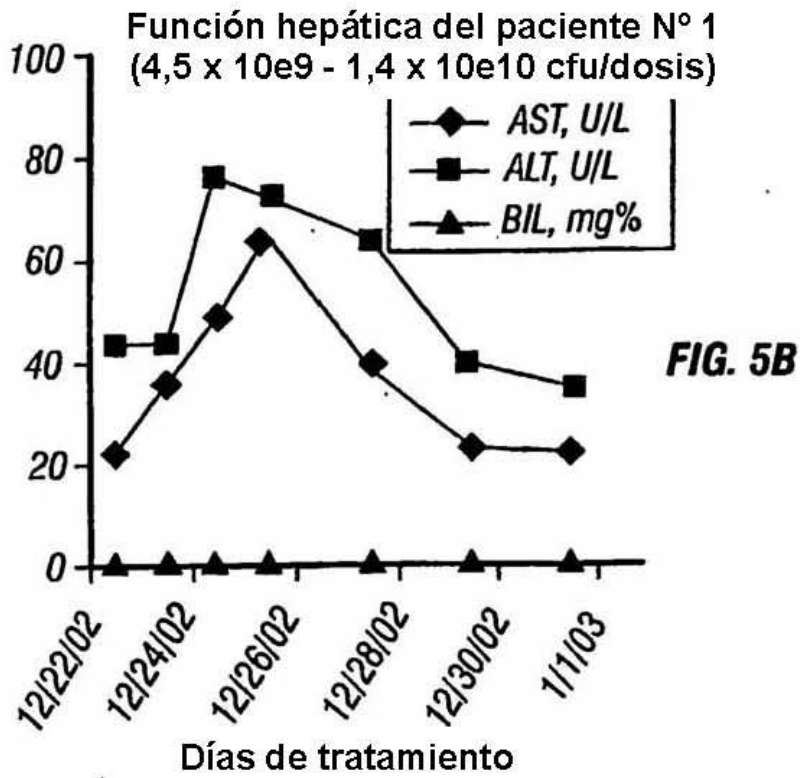


FIG. 5A



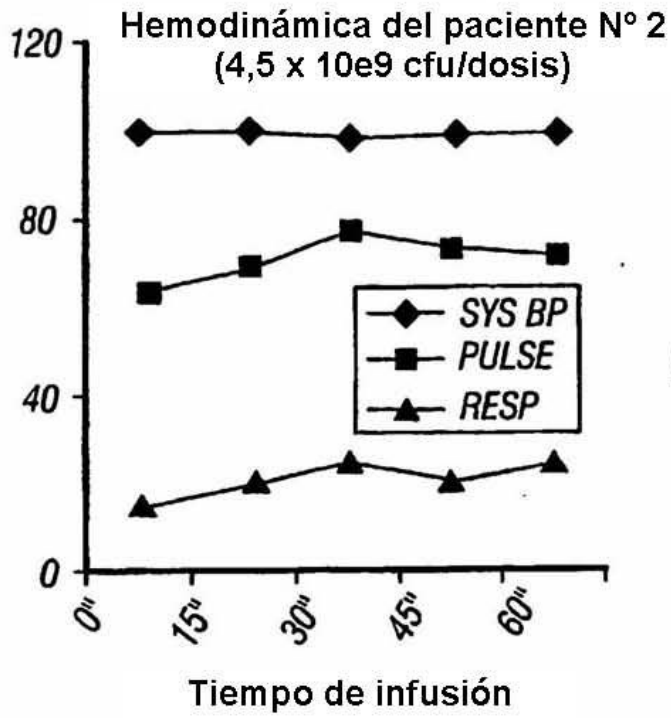


FIG. 6A

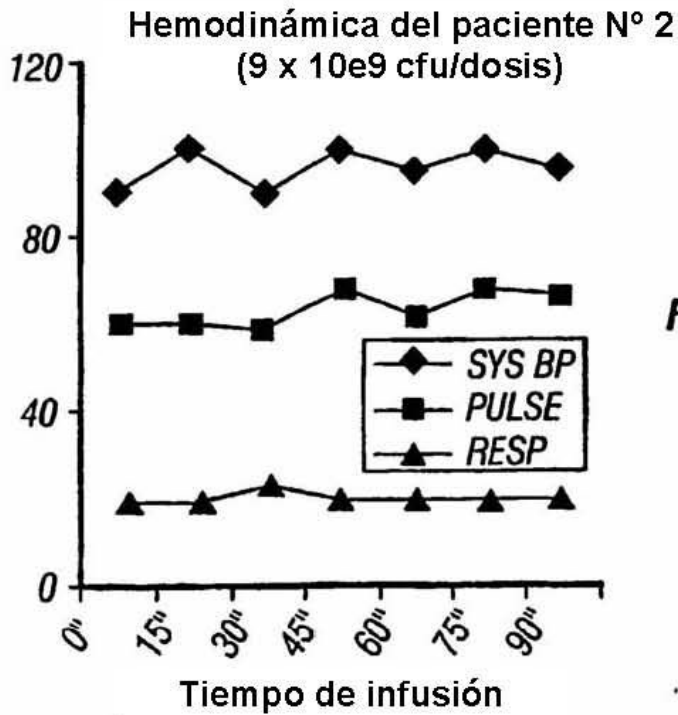
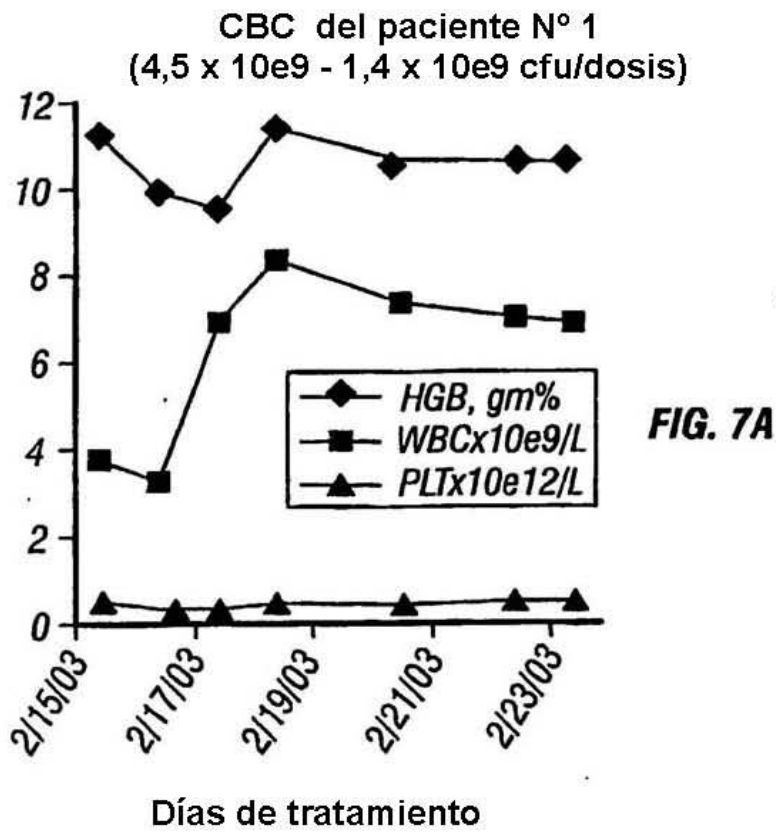
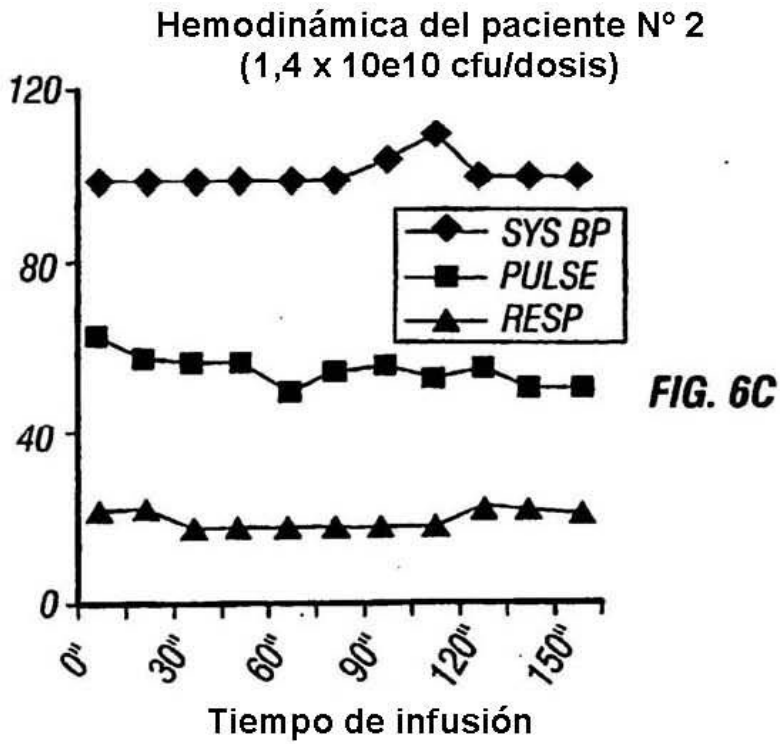


FIG. 6B



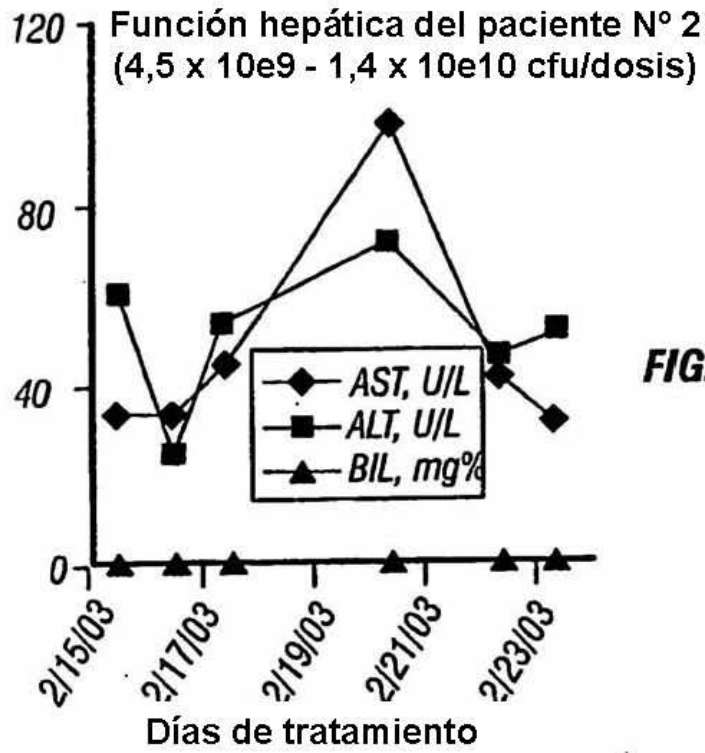


FIG. 7B

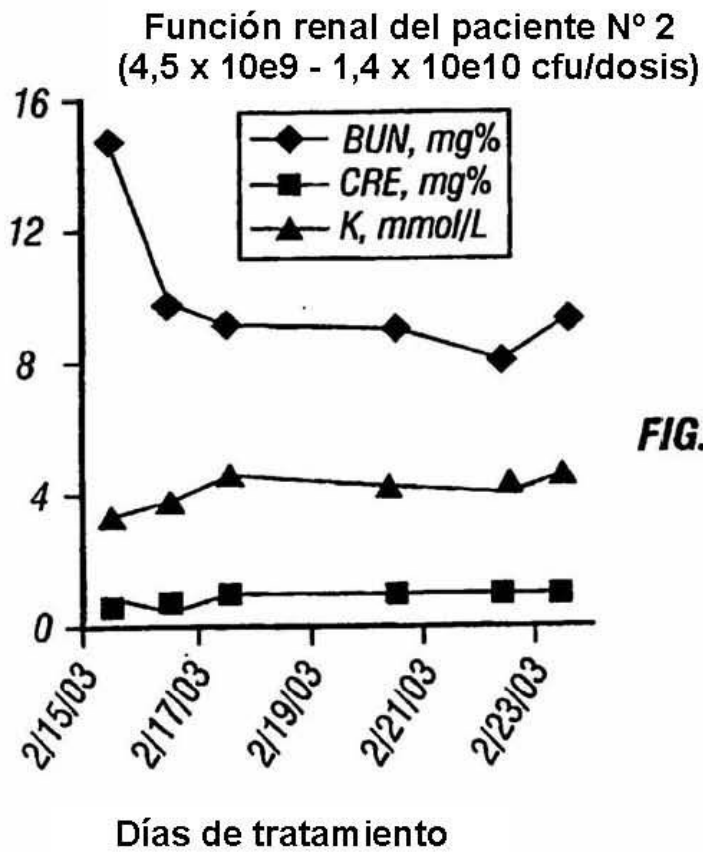
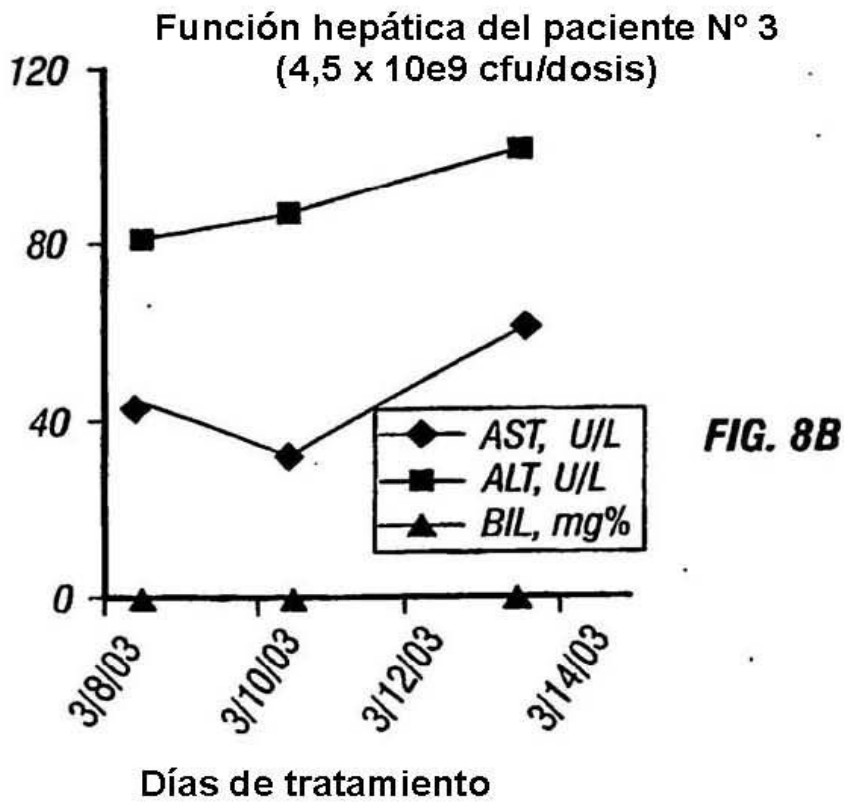
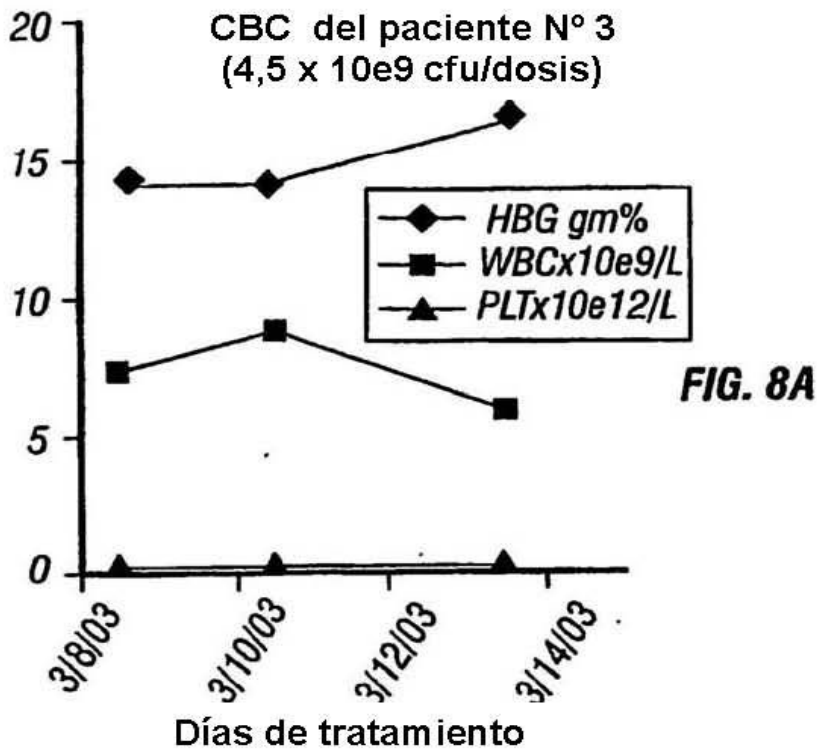


FIG. 7C



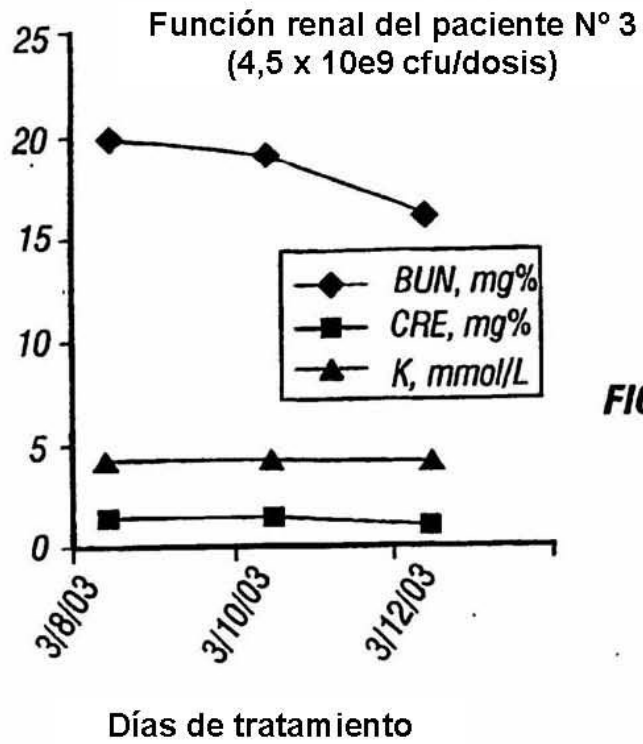


FIG. 8C

Tamaño medio de la nanopartícula de Rexin-G
Por detección de Dispersión de Luz Dinámica

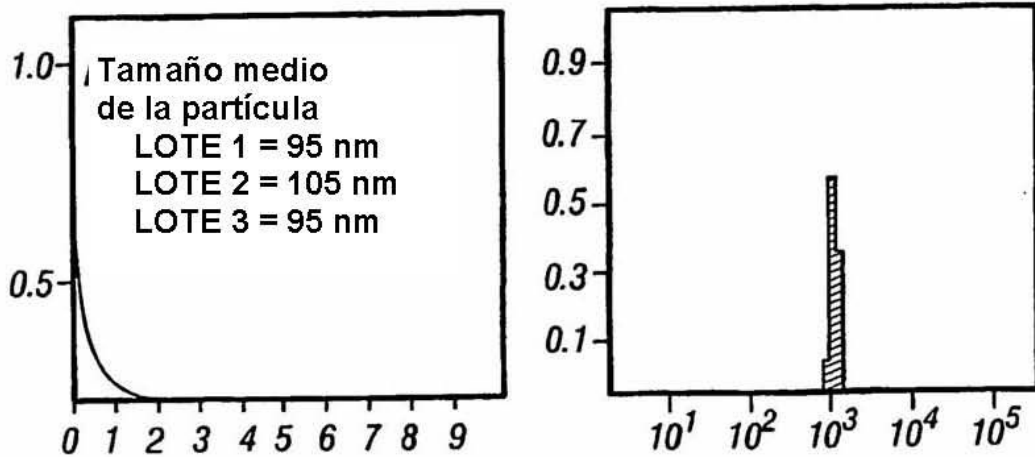


FIG. 9

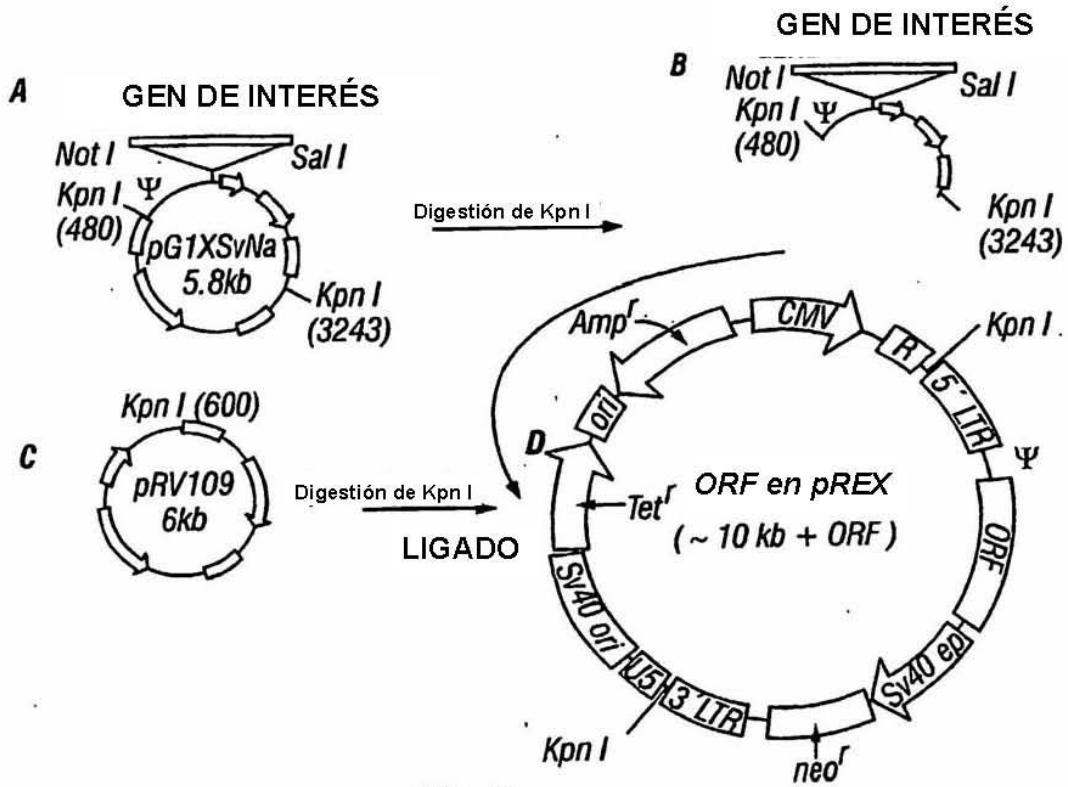


FIG. 10

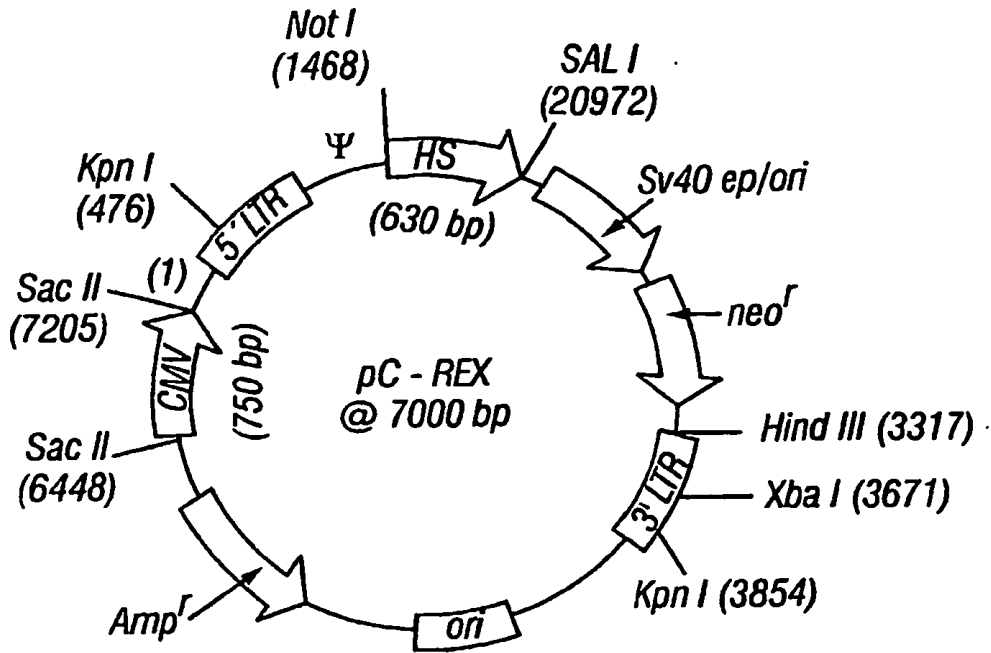


FIG. 11A

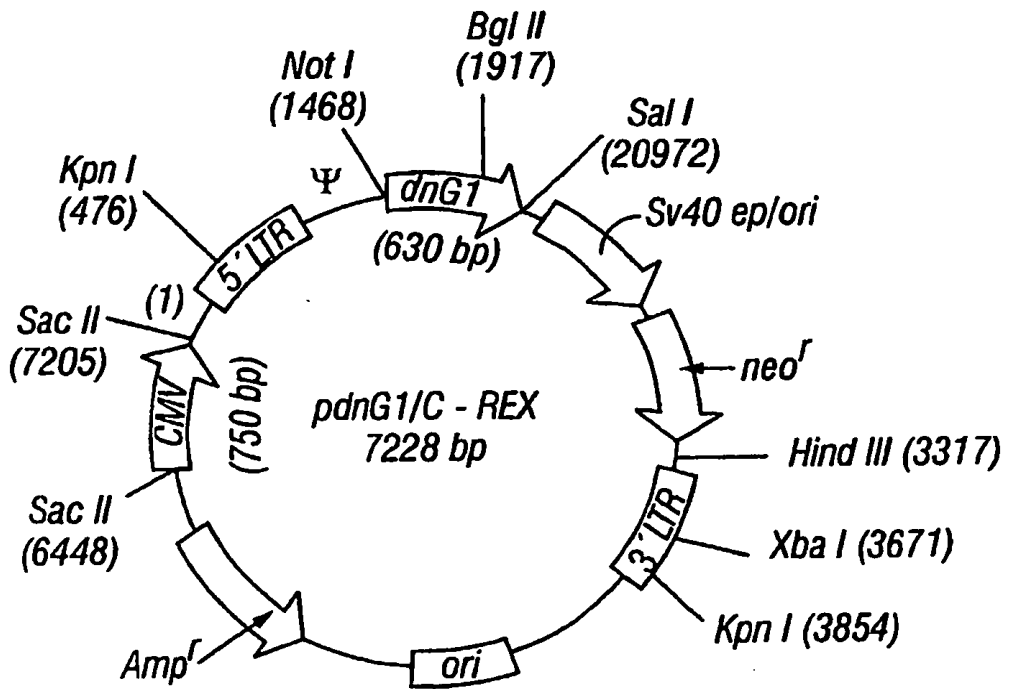


FIG. 11B

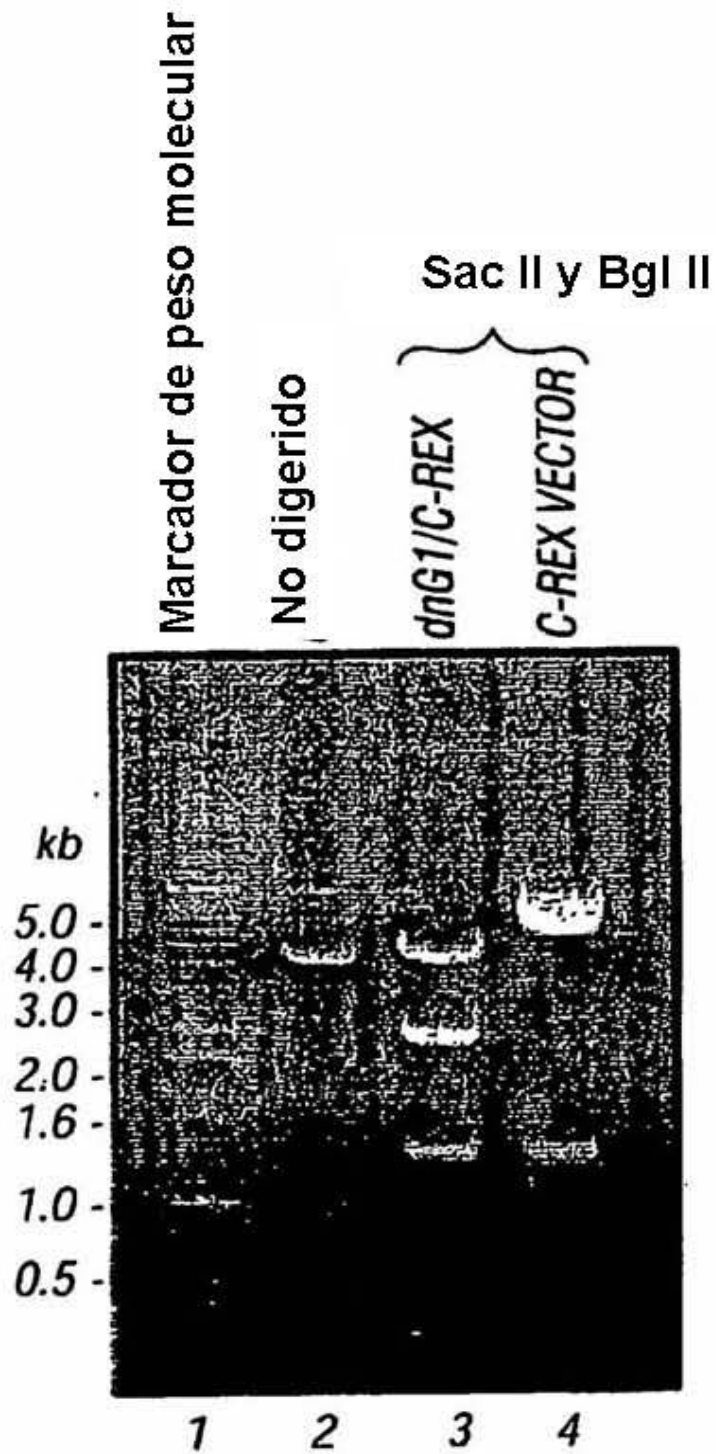


FIG. 11C

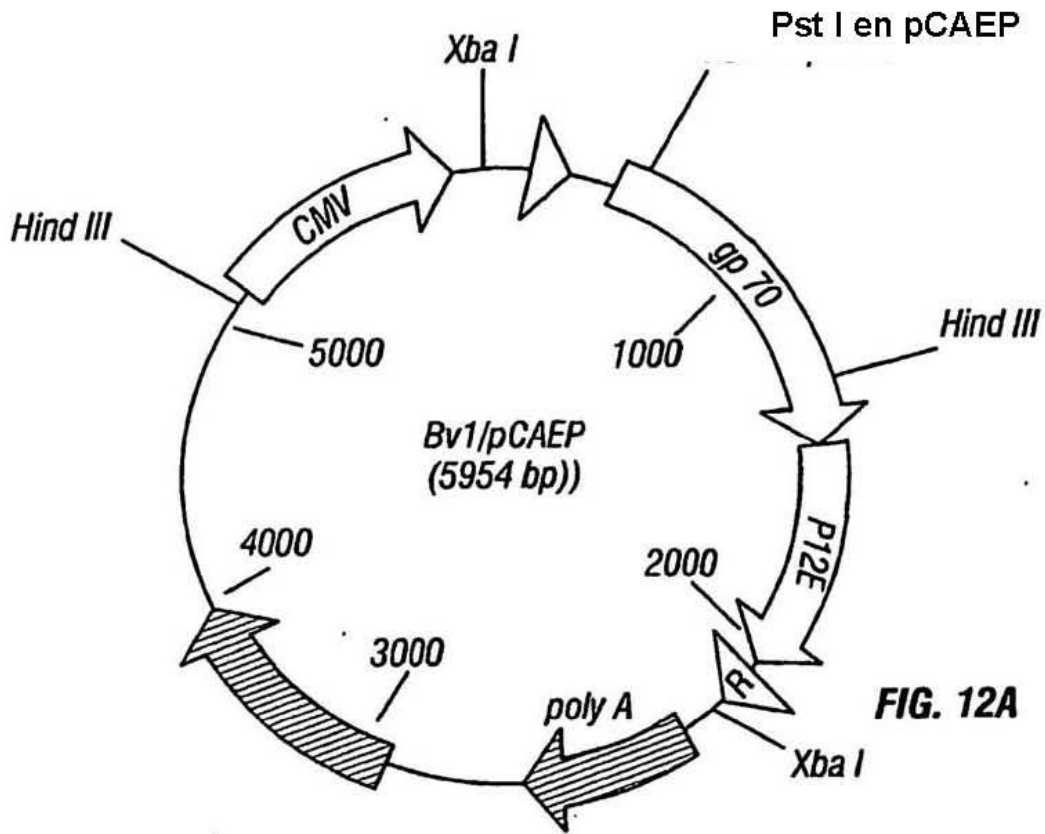


FIG. 12A

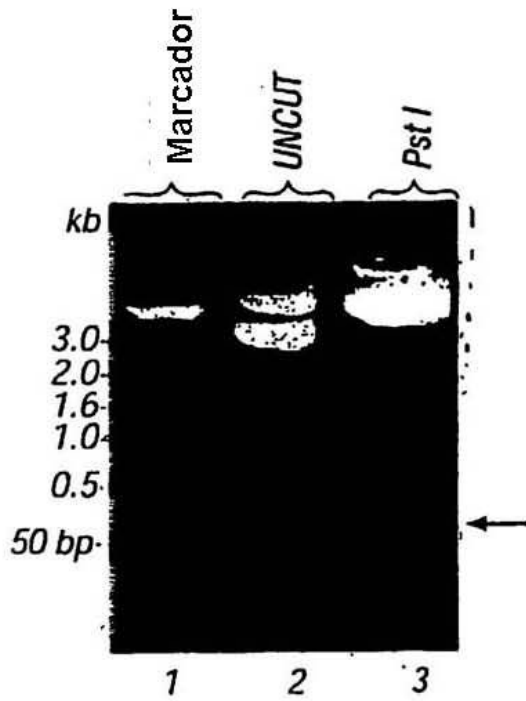


FIG. 12B

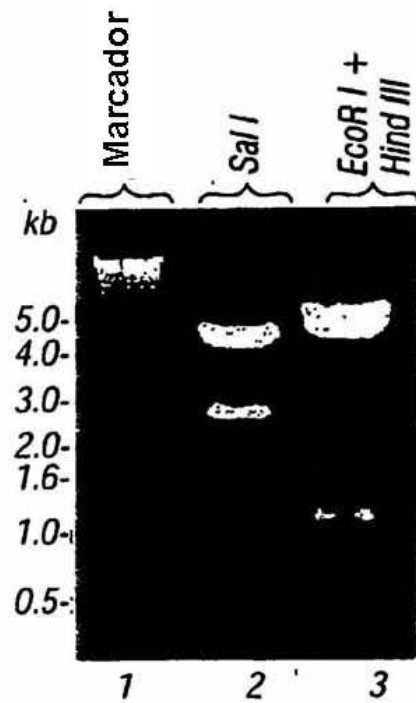
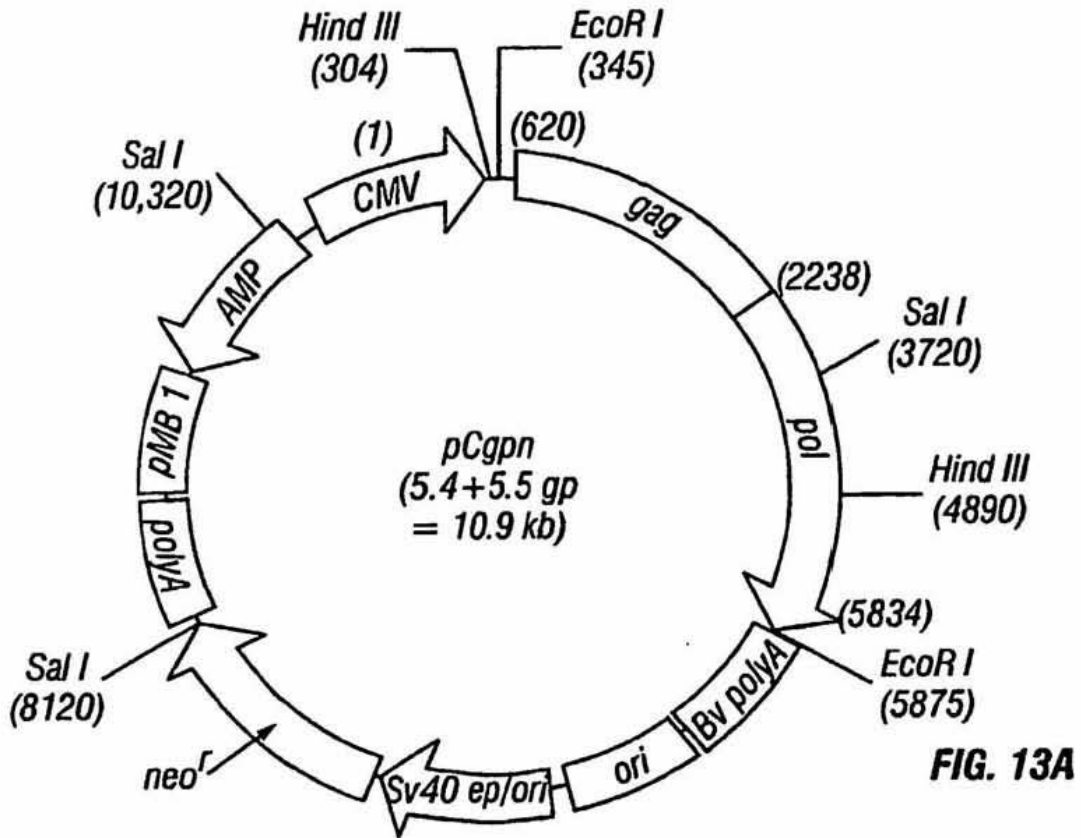


FIG. 13B

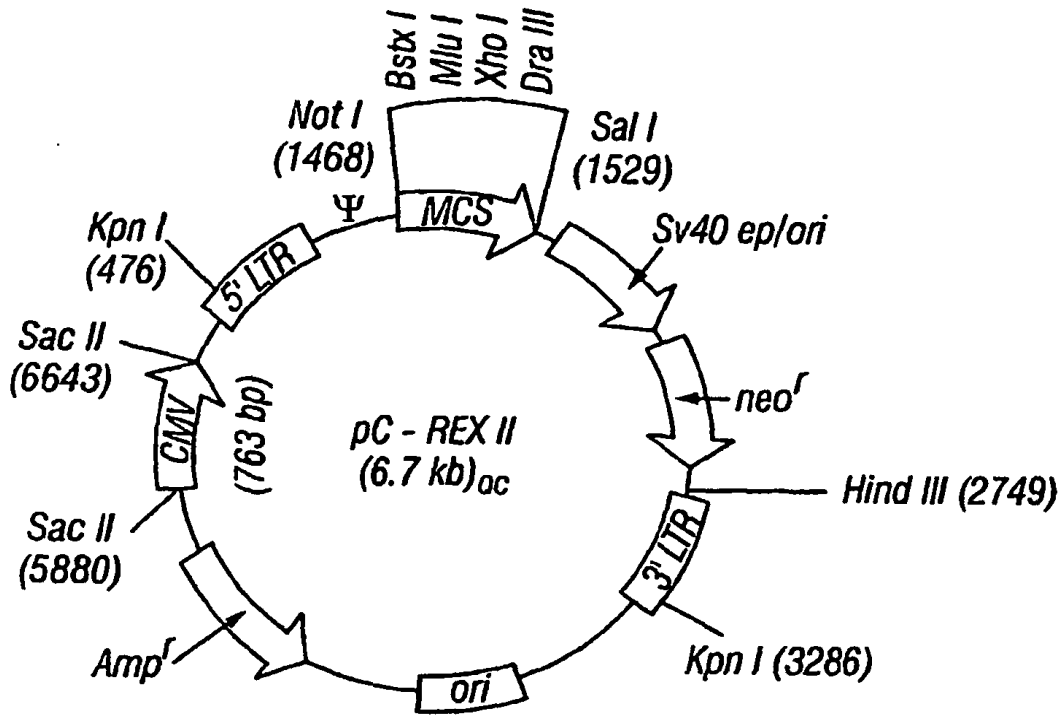


FIG. 14

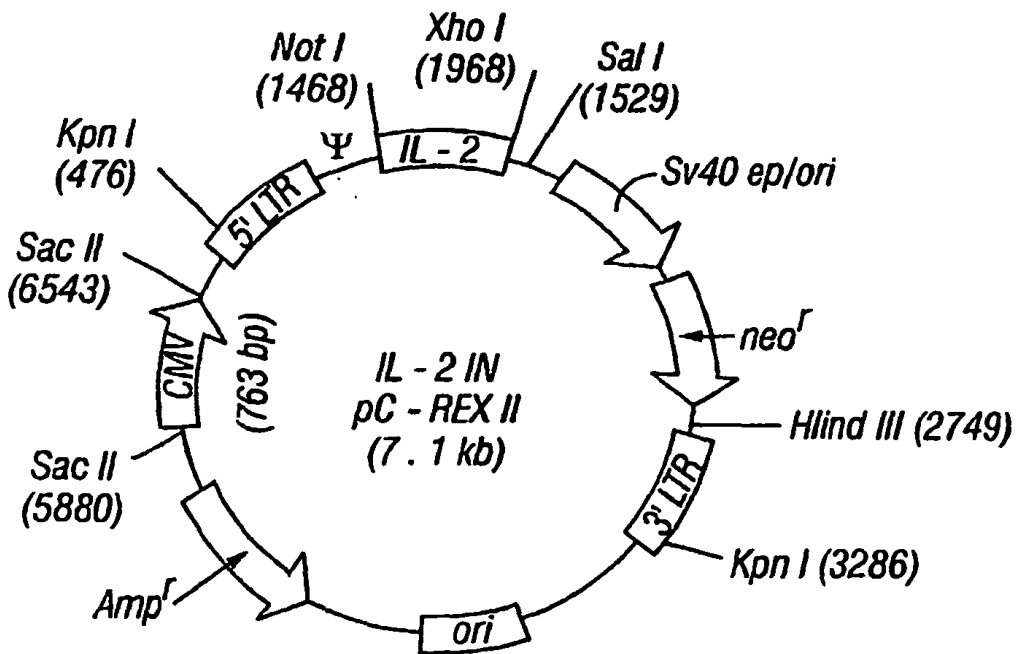


FIG. 15

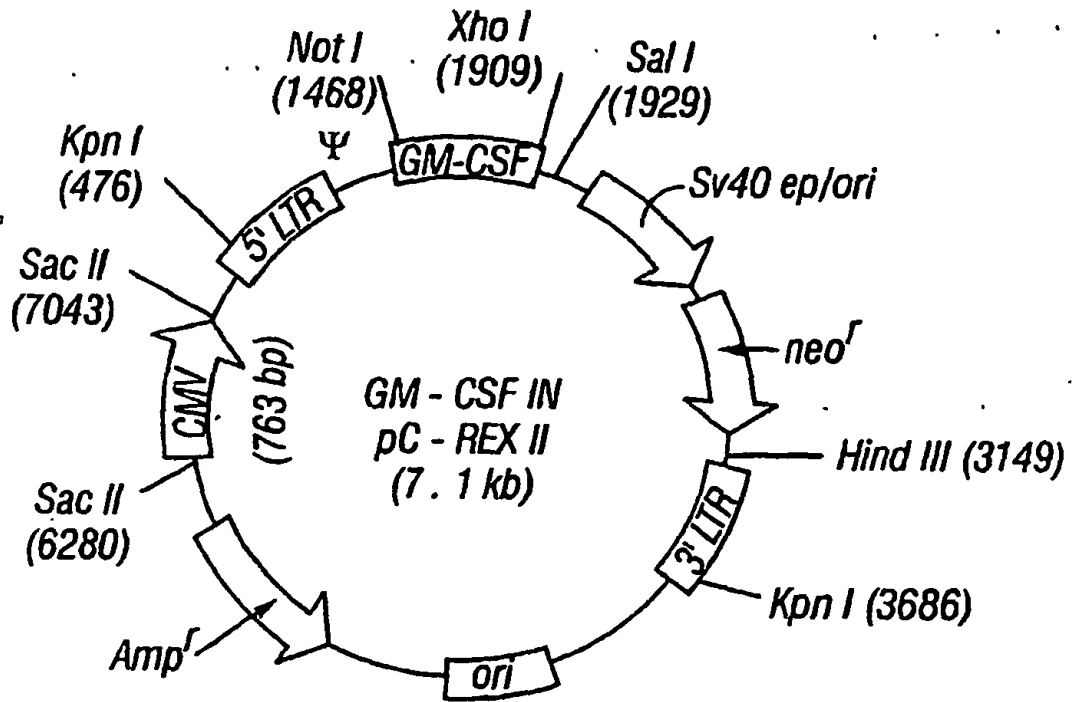
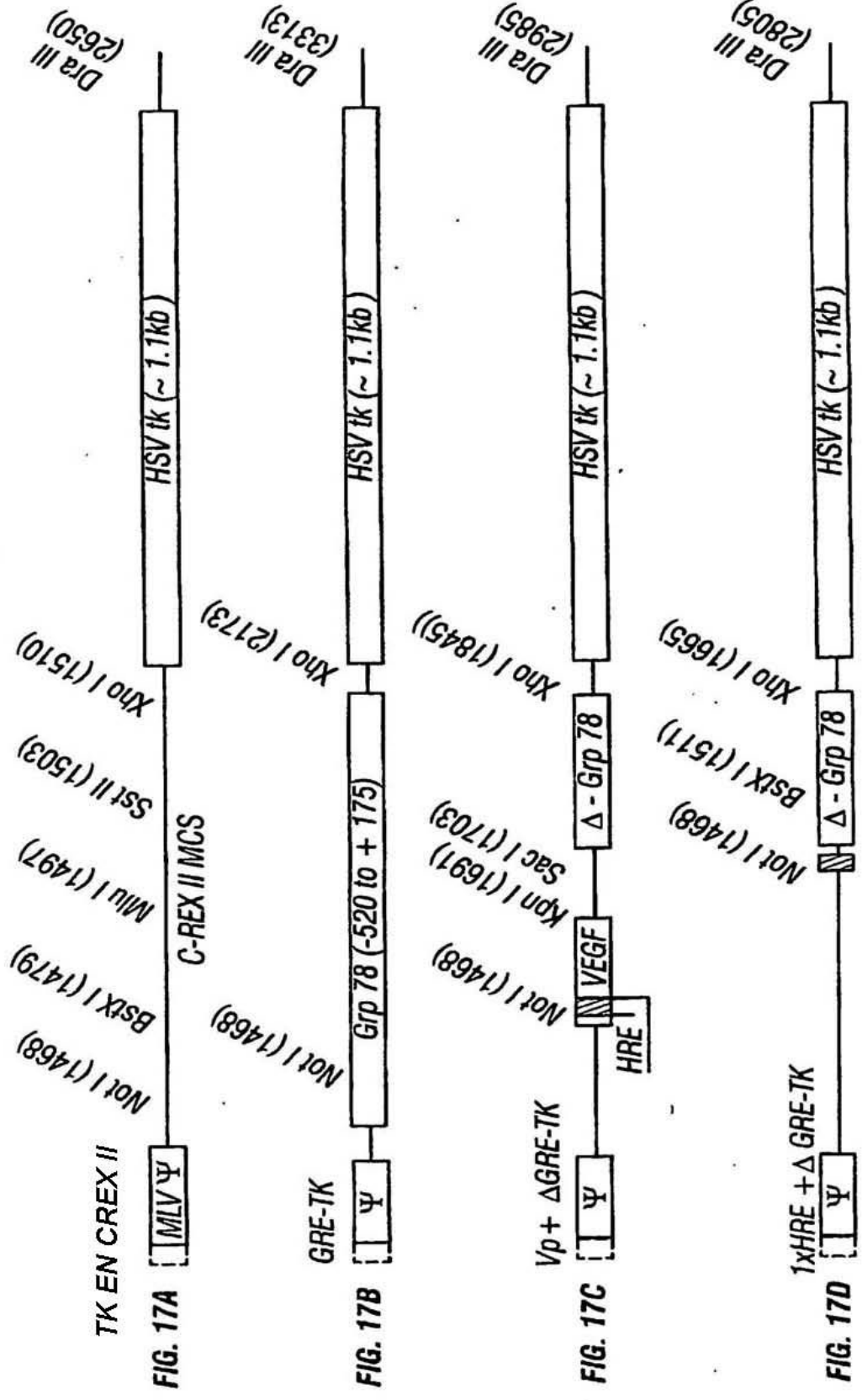


FIG. 16



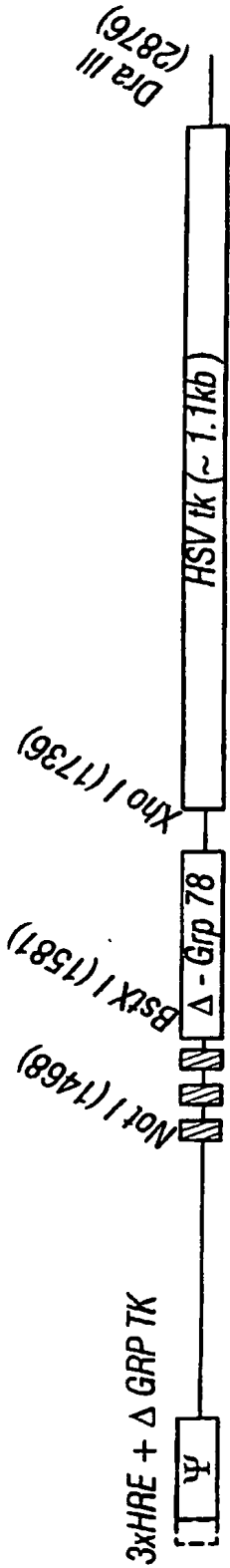


FIG. 17E

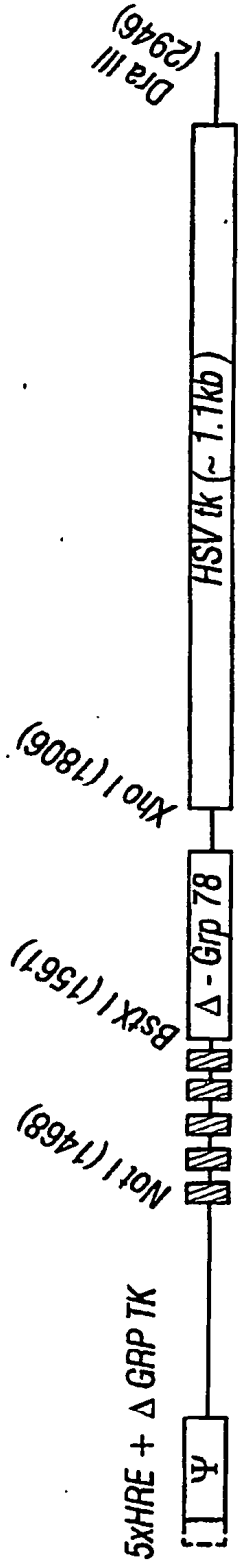


FIG. 17F

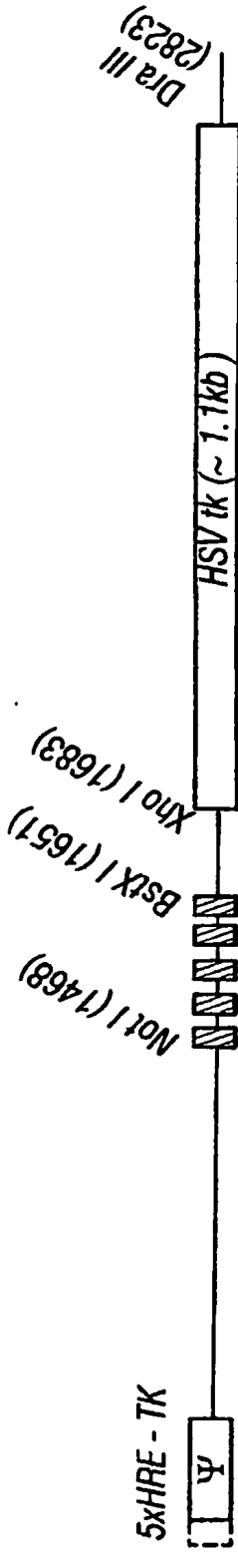
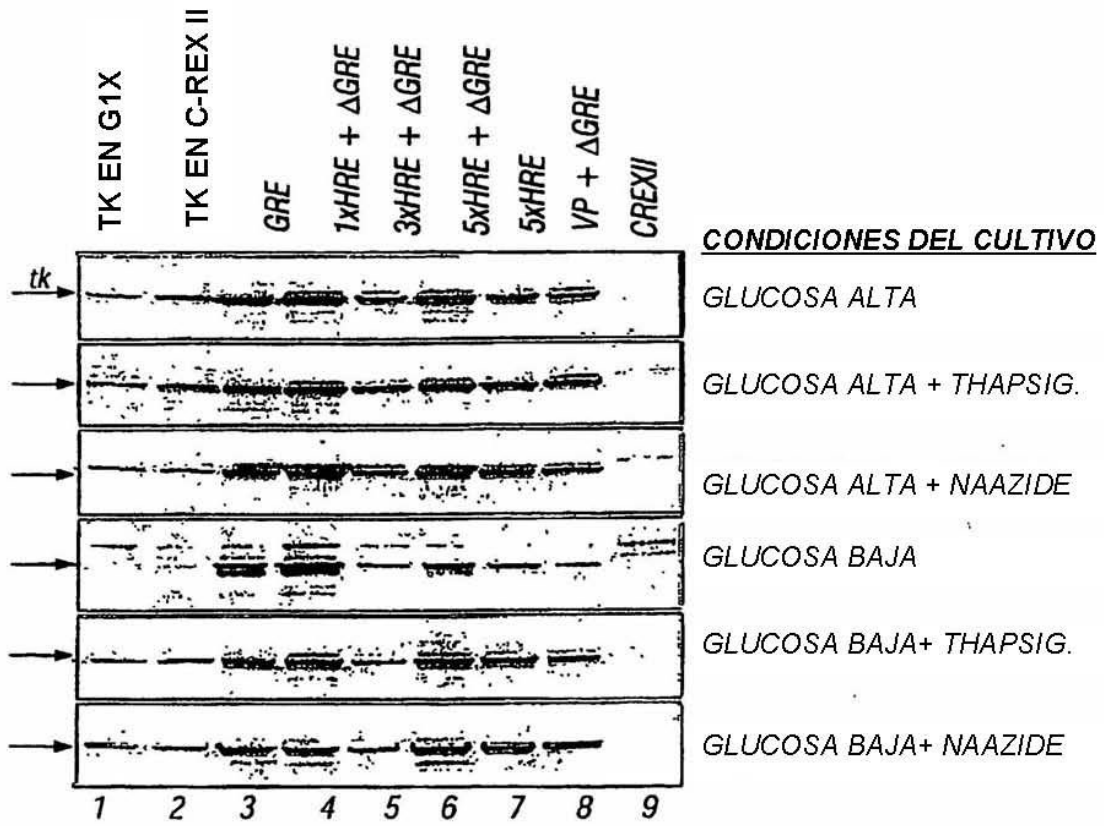


FIG. 17G



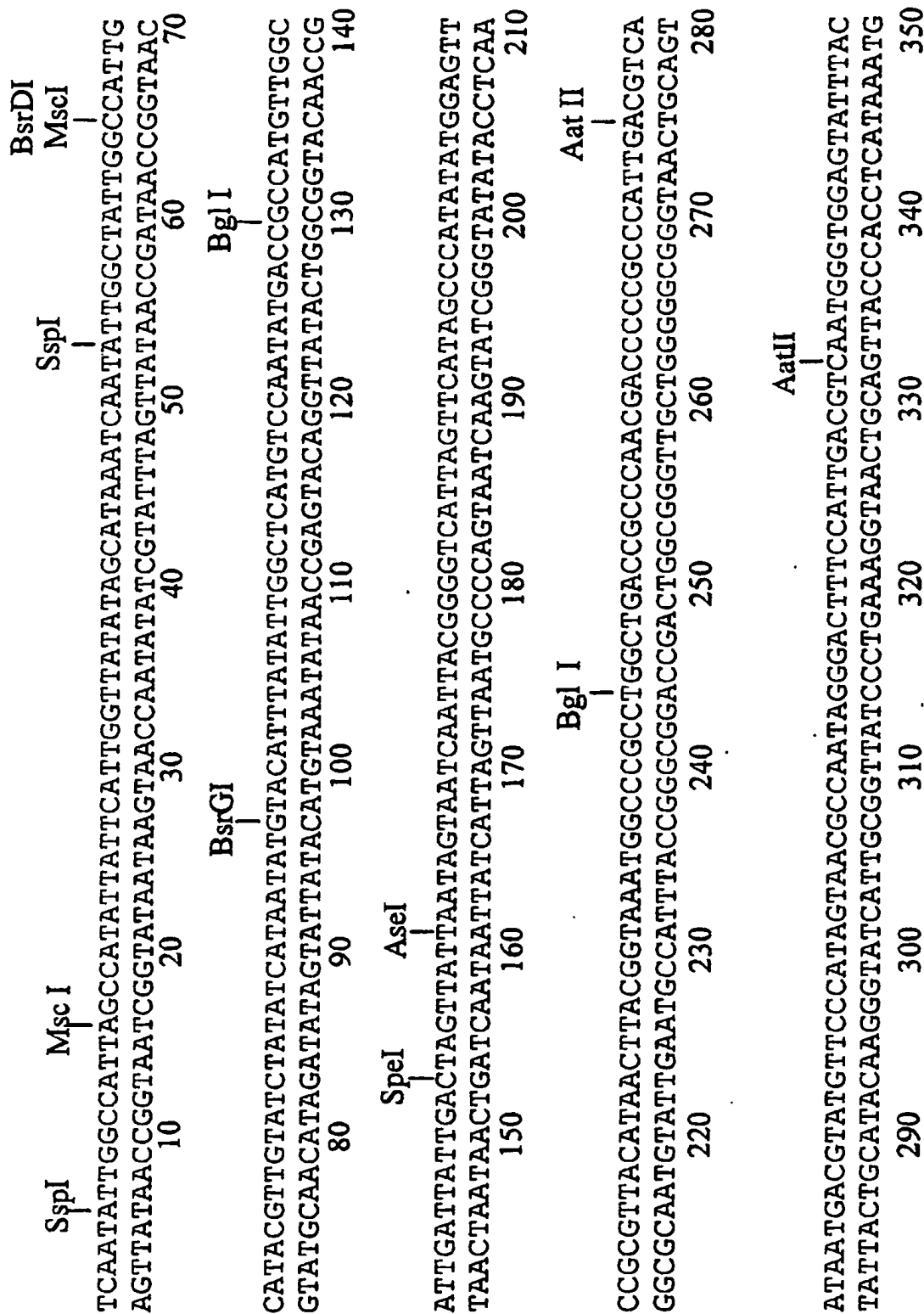


FIG. 18

Bgl I Nde I Aat II
 | | |
 GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACCGTCAATGA
 CCATTTGACGGGTGAACCGTCATGTAGTTCACATAGTATACGGTTCAGCGGGGATAACTGCAGTTACT
 360 370 380 390 400 410 420

 Bgl I
 |
 CGGTAAATGGCCCGCCTGGCAATTAATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTCCCTACTTGGCAGTACATC
 GCCATTTACCGGGCGGACCGTAATAACGGGTCACTGTAATGCCCTGAAAGGATGAACCGTCACTGTAG
 430 440 450 460 470 480 490

 SnaBI NcoI
 | |
 TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTGGCAGTACACCAATGGCGGTGGATAGCGGT
 ATGCATAATCAGTAGCGATAAATGGTACCACTACGCCAAAACCGTCACTGTTACCCGCCACCTATCGCCA
 500 510 520 530 540 550 560

 AatII
 |
 TTGACTCACGGGGATTCCCAAGTCGCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTGGCACCAAAATCA
 AACTGAGTGCCCCCTAAAAGGTTTCAGAGGTGGGTAACCTGCAGTTACCCCTCAAACAAAACCGTGGTTTAGT
 570 580 590 600 610 620 630

 Sgf I PvuI
 | |
 ACGGACTTCCAAAATGTCGTAAACAACGTCGGATCGCCCGCCCGTTCGACGCAAAATGGCGGTAGCGGTG
 TGCCCTGAAAGGTTTTACAGCATTTGTTGACCGCTAGCGGGCGGCAACTGCGGTTTACCCGCCATCCGCAC
 640 650 660 670 680 690 700

 SacI Ecl136 II HindIII
 | | |
 TACGGTGGAGGTCATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACTAGAAGCTTTATTGCGGT
 ATGCCACCCCTCCAGATATATTCGTCTCGAGCAAAATCACTTGGCAGTCTAGTGATCTTCGAAAATAACGCCA
 710 720 730 740 750 760 770

FIG. 18
(Continuación)

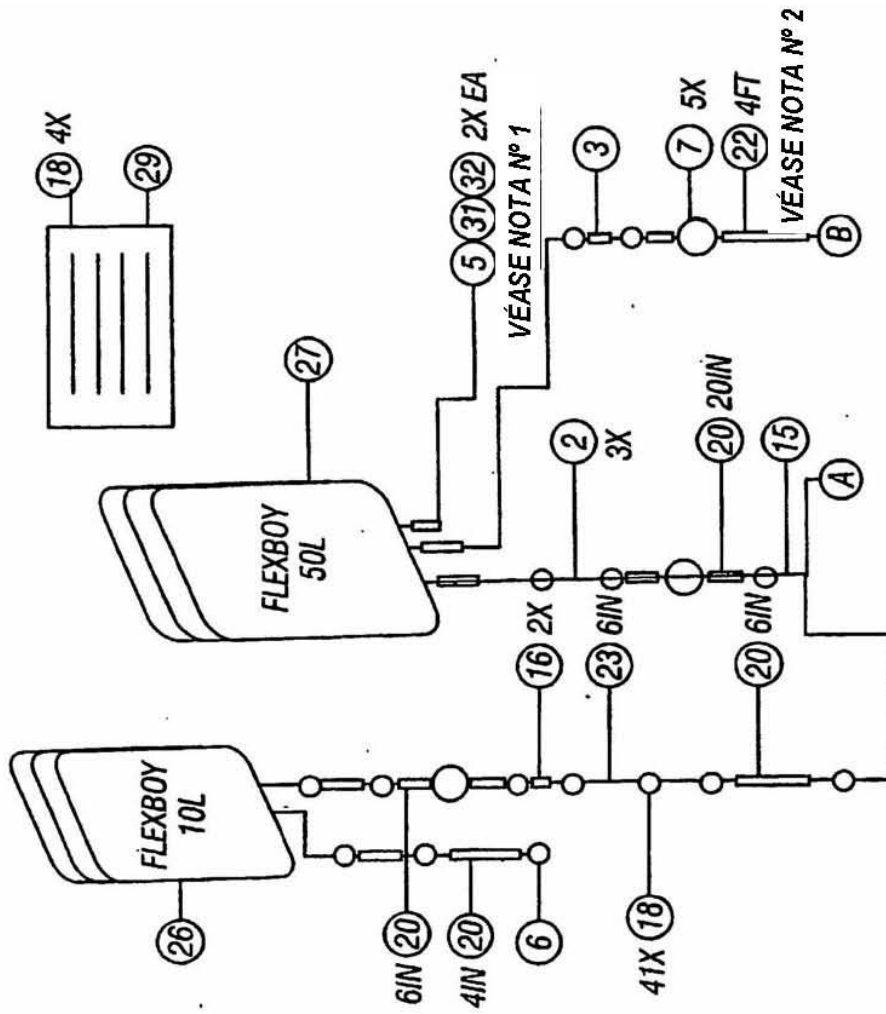


FIG. 19A

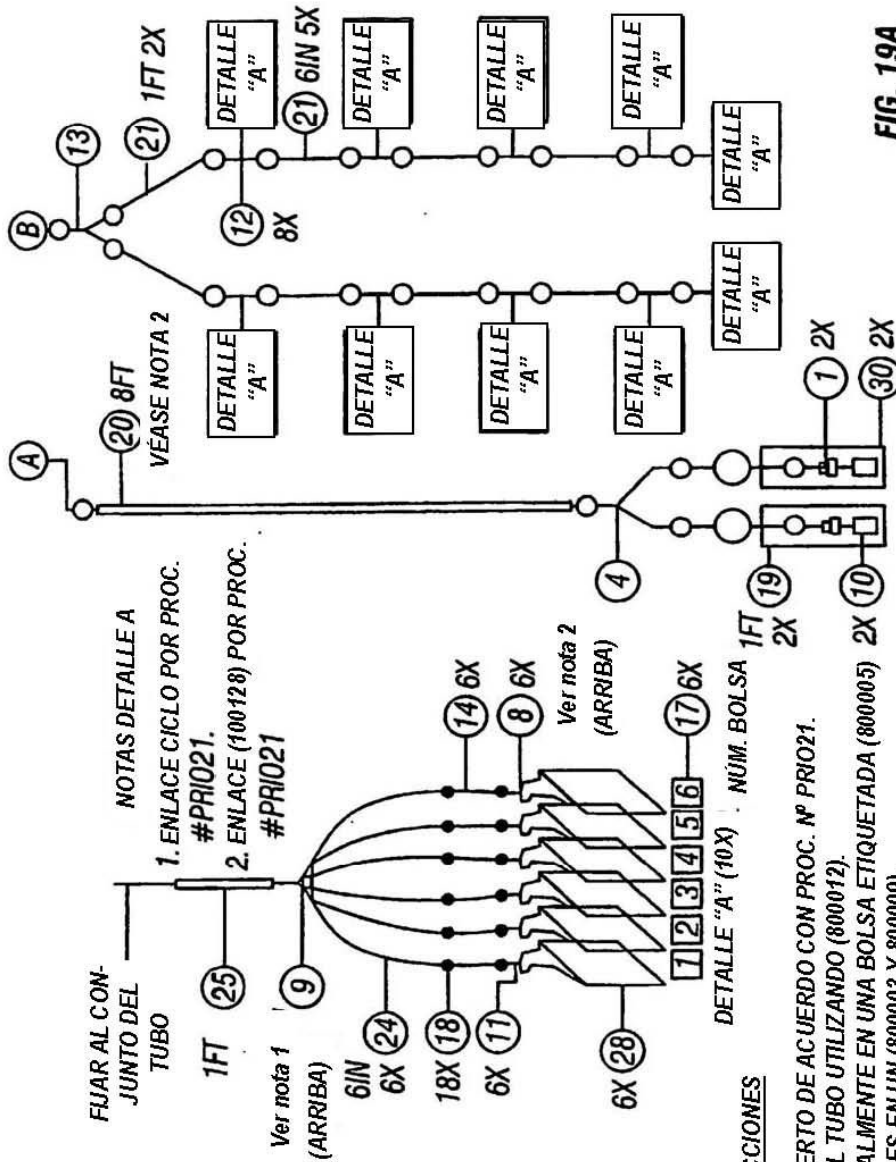


FIG. 19A

(Continuación)

INSTRUCCIONES

1. FJAR (100061) AL PUERTO DE ACUERDO CON PROC. N° PRI021.
2. ENROLLAR Y FJAR EL TUBO UTILIZANDO (800012).
3. PRECINTAR INDIVIDUALMENTE EN UNA BOLSA ETIQUETADA (800005).
4. COLOCAR (5) UNIDADES EN UN (800003 Y 800009).
5. ESTERILIZAR EL PRODUCTO.

| UNIDADES DE MEDIDA; COMPONENTES = CADA/TUBOS = PIES | | | | |
|---|-----------------|--|---------------|-------|
| Nº | Nº Serie Stedim | Descripción | Material | Cant. |
| | | Acoplamiento hembra, 3/8" | Polycarbonato | |
| | | Racor manguera, 3/8" a 3/8" | Polycarbonato | |
| | | Racor manguera reductor, 1/4" 3/8" | Polycarbonato | |
| | | Conector en Y, 3/8", 3/8", 3/8" | Polycarbonato | |
| | | Puerto adicional (sin látex) TD | ABS/ISP/PP | |
| | | Tapón, Tubo, transparente 1/2 x 1/2 x | Acrílico | |
| | | Pinza Hoffman de Tornillo 3/8" y 1/2 TUB | Poliéster | |
| | | Puerto dosificador (EVA) | EVA | |
| | | Conector 5 vías (TD00-261) | | |
| | | Tapón MPC, Macho | Polycarbonato | |
| | | Tapón, Tubos 6/32" | Polipropileno | |
| | | Conector T, (3/16") | Polipropileno | |
| | | Conector Y, (1/4") | Polipropileno | |
| | | Racor manguera, 5/32" a 1/4" | Polycarbonato | |
| | | Conector en T, 3/8", 3/8", 3/8" | PVC/Norton | |
| | | Racor manguera, 3/8" a 1/8" | Polycarbonato | |
| | | Sujetacables, 7" ID (W/RAT SU) | Nylon | |
| | | Sujetacables negro, 5,6" x 14" | Nylon 12 | |
| | | Tubo 3/8"ID x 3/32" pared | Silicona | |
| | | Tubo pared gruesa, 3/8" x 1/8" | Silicona | |
| | | Tubo 3/16"ID x 1/16" pared | Silicona | |
| | | Tubo 1/4"ID x 1/8" pared | Silicona | |
| | | Tubo, Tyg, Med GR 1/8" ID x 1/16 W | PVC | |
| | | Tubo, Tygon, Med GR 5/32" x 1/32 W | PVC | |
| | | Tubo, Tygon, Med GR 5/32" x 1/16 W | PVC | |
| | | Flexboy 10L, 3 puertos desnudos, NS | STEDIM 71 | |
| | | Flexboy 50L, 3 puertos desnudos, NS | STEDIM 71 | |
| | | Bolsa, Flexboy 500ML, 3 puertos desnudos | STEDIM 71 | |
| | | Bolsa, Poli, 8" x 10" | Plástico | |
| | | Bolsa, Poli, 3" x 5" | Plástico | |
| | | Adhesivo, Loctite, 4011 | Cyanoacryl | |
| | | Imprimador, Loctite, 7701 | N-Heptano | |
| | | Indicador de radiación, Impreso | Papel | |
| | | Bolsa, Poli, (42" x 26" x 63") | Polycarbonato | |
| | | Bolsa, Poli, 24" x 36" (6ML) | Polycarbonato | |
| | | Embalaje cartón, medio | Cartón | |
| | | Sujetacables, revestido, 8" | Nylon | |

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citado en la descripción

- WO 0164870 A [0085]
- WO 9007936 A [0090]
- WO 9403622 A [0090]
- WO 9325698 A [0090]
- WO 9325234 A [0090]
- US 5219740 A [0090]
- WO 9311230 A [0090]
- WO 9310218 A [0090]
- US 4777127 A [0090]
- GB 2200651 A [0090]
- EP 0345242 A [0090]
- WO 9102805 A [0090]
- WO 9412649 A [0090]
- WO 9303769 A [0090]
- WO 9319191 A [0090]
- WO 9428938 A [0090]
- WO 9511984 A [0090]
- WO 9500655 A [0090]
- US 5962429 A [0105]
- US 4683195 A, Mullis [0166]

10

Bibliografía de patentes citada en la descripción

- **Tseng ; Mulligan.** Surg. Oncol. Clin. N. Am., 2002, vol. 11, 537-569 [0002]
- **Gordon et al.** Cancer Res., 2000, vol. 60, 3343-3347 [0002]
- **Gordon et al.** Hum. Gene Ther., 2001, vol. 12, 193-204 [0002]
- **Lenz et al.** Human Gene Therapy, 10 August 2002, vol. 13, 1515-1537 [0003]
- **O'Reilly et al.** Cell, 1997, vol. 88, 277 [0026]
- **Hall et al.** Hum Gene Ther, 1997, vol. 8, 2183-92 [0060]
- **Hall et al.** Hum Gene Ther, 2000, vol. 11, 983-93 [0060]
- **Gordon et al.** Hum Gene Ther, 2001, vol. 12, 193-204 [0060]
- **Gordon et al.** Vector Targeting Strategies for Therapeutic Gene Delivery. Wiley-Liss, Inc, 2002, 293-320 [0060]
- **Lin et al.** Nucl. Acids Res., 1994, vol. 22, 5220-5234 [0063]
- **Jellinek et al.** Biochemistry, 1995, vol. 34, 11363-11372 [0063]
- **Pagratís et al.** Nature Biotechnol., 1997, vol. 15, 68-73 [0063]
- **Graham et al.** Virology, 1973, vol. 52, 456 [0074]
- **Sambrook et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 1989 [0074]
- **Davis et al.** Basic Methods in Molecular Biology, 1986 [0074]
- **Chu et al.** Gene, 1981, vol. 13, 197 [0074]
- **Curriel.** Hum. Gene Ther., 1992, vol. 3, 147 [0090]
- **Belmont et al.** Molec. and Cell. Biol., 1988, vol. 8 (12), 5116-5125 [0093]
- **Dhawan et al.** Science, 1991, vol. 254, 1509-1512 [0094]
- **R. I. Freshney.** Culture Of Animal Cells. Alan R Liss, Inc, 1987 [0166]
- Immobilized Cells And Enzymes. IRL Press, 1986 [0166]
- **B. Perbal.** A Practical Guide To Molecular Cloning. 1984 [0166]
- Methods In Enzymology. Academic Press, Inc, [0166]
- **Yao.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, vol. 88, 8101-8105 [0094]
- **Armentano.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, 6141-6145 [0094]
- **Morecki et al.** Cancer Immunol. Immunother., 1991, vol. 32, 342-352 [0094]
- **Apperly.** Blood, 1991, vol. 78, 310-317 [0094]
- **Pear et al.** PNAS, 1993, vol. 90, 8392-8396 [0096]
- Chemistry of ligand-coupling to liposomes. Liposomes as Tools for Basic Research and Industry. CRC Press, 1995, 21-37 [0104]
- **Fasbender et al.** J. Biol. Chem., vol. 272, 6479-6489 [0105]
- **Hodgson ; Solaiman.** Nature Biotechnology, 1996, vol. 14, 339-342 [0105]
- **Culver et al.** Science, 1992, vol. 256, 1550-1552 [0107]
- **Hall et al.** Human Gene Therapy, 1997, vol. 8, 2183-2192 [0134]
- **Morgan et al.** Journal of Virology, 1967, vol. 67, 4712-4721 [0134]
- **Hall et al.** Human Gene Therapy, 2000, vol. 11, 983-993 [0134]
- **Markowitz et al.** Journal of Virology, 1988, vol. 62, 1120-1124 [0136]
- **Wu et al.** Oncology Reports, 1994, vol. 1, 705-11 [0138]
- **Soneoka et al.** Nucleic Acid Research, 1995, vol. 23, 628-633 [0139]
- Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0166]
- DNA Cloning. 1985, vol. I, II [0166]
- Oligonucleotide Synthesis. 1984 [0166]
- Nucleic Acid Hybridization. 1984 [0166]
- Transcription And Translation. 1984 [0166]
- Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0166]
- Methods In Enzymology. vol. 154, 155 [0166]
- Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology. Academic Press, 1987 [0166]
- Handbook Of Experimental Immunology. 1986, vol. I-IV [0166]
- Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986 [0166]