(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 382 036**

(51) Int. CI.:

C07K 19/00	(2006.01)
C07K 14/015	(2006.01)
C12N 9/12	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
A01K 67/027	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **04729841 .9**

(96) Fecha de presentación: **28.04.2004**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1620468**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

(54) Título: **Polipéptido de fusión adecuado como citotoxina**

(30) Prioridad:
30.04.2003 EP 03009952

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

(73) Titular/es:
DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS
IM NEUENHEIMER FELD 280
69120 HEIDELBERG, DE

(72) Inventor/es:
NÜESCH, Jürg, P., F. y
ROMMELAERE, Jean

(74) Agente/Representante:
Arizti Acha, Monica

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

Polipéptido de fusión adecuado como citotoxina.

La presente invención se refiere a polipéptidos de fusión que comprenden (a) un sitio de unión para la tropomiosina que comprende los aminoácidos 235-379 de la proteína NS1 de parvovirus y (b_1) caseína cinasa II (CKIIα) o el dominio catalítico de la misma, o (b_2) un fragmento de CKIIβ que comprende un sitio de unión para CKIIα, y secuencias de ácido nucleico que codifican para dichos polipéptidos de fusión. Además, la presente invención se refiere al uso de dichos polipéptidos de fusión para la preparación de una composición farmacéutica para, por ejemplo, el tratamiento de enfermedades asociadas con la presencia de una población celular aberrante, preferiblemente cáncer o SIDA.

Por muchos motivos es deseable generar y usar toxinas que preferentemente destruyan las células transformadas de manera neoplásica. En el pasado esto se ha logrado con compuestos químicos (citotoxinas, citostáticos), que con más o menos especificidad permitieron un tratamiento satisfactorio del cáncer después de la cirugía. Además de la selectividad, un problema principal de tales compuestos consiste en los efectos secundarios y también en la falta de direccionamiento competente de la sustancia, que lleva al requerimiento de dosis relativamente altas. Se cree que una forma de sortear este problema viene dada por el uso de genética dirigida usando virus recombinantes para llevar elementos genéticos a los tumores conduciendo a una expresión de la toxina en el sitio. Se ha demostrado que los parvovirus autónomos tales como KRV, MVM o H-1 se propagan preferentemente dentro y para destruir células transformadas de manera neoplásica. Además, consisten en una clase de virus que, a pesar de causar viremia en su huésped infectado, producen principalmente una infección no patogénica. Por esos motivos, se cree que los parvovirus autónomos son excelentes herramientas para la terapia génica del cáncer. Intereses particulares se centran en vectores recombinantes que mantienen su oncotropismo natural, así como su potencial oncolítico y oncosupresor. Sin embargo, hasta ahora, poco se sabe sobre la naturaleza del potencial oncosupresor de los parvovirus (que es independiente del replicón parvoviral) y, por consiguiente, el uso terapéutico de dichos virus, por ejemplo, incorporados en sistemas heterólogos como adenovirus recombinantes o virus del sarampión, para terapia génica dirigida, por ejemplo la terapia contra el cáncer todavía está en sus inicios.

El documento EP 1 275 658 A1 se refiere a composiciones que comprenden una variante de VP1 de parvovirus y una proteína NS I de parvovirus para la inducción de citólisis.

El documento EP 1 077 260 A1 muestra anticuerpos contra NS1.

Por tanto, el problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar medios basados en parvovirus para terapia génica, en particular para terapia contra el cáncer dirigida, que superen las desventajas de los métodos terapéuticos de la técnica anterior, por ejemplo, con respecto a efectos secundarios y falta de especificidad.

La solución a dicho problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Los experimentos que dan como resultado la presente invención se basaron en observaciones de que el principal componente implicado en la destrucción celular, y por tanto la actividad oncolítica de parvovirus autónomos, consiste en NS1, la principal proteína no estructural, que desempeña un papel importante durante la replicación de partículas virales de la progenie. La caracterización de NS1 reveló una proteína multifuncional dotada de una variedad de funciones enzimáticas y reguladoras, que tienen que actuar de manera coordinada durante una infección productiva. Particularmente, se mostró que las funciones citotóxicas de NS1 eran dependientes de la integridad de los sitios de fosforilación (PKC), llevando a la disección (al menos en parte) de las funciones replicativas de NS1 de sus actividades citotóxicas por medio de mutagénesis dirigida al sitio. Para diseñar toxinas nuevas eventualmente más eficaces y específicas es importante entender los mecanismos de destrucción selectiva inducida por NS1 y en consecuencia eliminar funciones indeseadas y eventualmente incluso contraproducentes del polipéptido.

Con estas perspectivas se diseñaron nuevos polipéptidos / compuestos (deseablemente pequeños) con características diferenciadas basándose en la destrucción celular inducida por NS1, independiente de las funciones replicativas del polipéptido. Analizando las funciones citotóxicas de NS1 se demostró que regiones bastante diferenciadas del polipéptido son más importantes para la destrucción celular que sus actividades enzimáticas. Estos descubrimientos llevaron a la conclusión de que regiones diferenciadas de NS1 podían interaccionar específicamente con proteínas asociadas celulares y que la(s) actividad(es) citotóxica(s) consiste(n) en un complejo multiproteico ensamblado mediante NS1 en vez de una actividad catalítica de la proteína viral sola. Además, la mutagénesis en sitios de fosforilación PKC consenso conservados llevó a la destrucción de las actividades tóxicas de NS1, lo que sugiere una fuerte regulación de esta propiedad de NS1. Los estudios iniciales que llevan a la presente invención implicaron que tal regulación de la toxicidad de NS1 no sólo ocurre de manera coordinada sincronizada mediante fosforilación a través de distintas cinasas, sino también por compartimentalización de la célula, llevando a la conclusión de que el direccionamiento de NS1 al sitio de acción es una característica adicional de regulación.

Pudieron identificarse dos proteínas asociadas que se unen con alta afinidad a NS1 de tipo natural, sin embargo, carecen de afinidad para mutantes dirigidos al sitio de NS1 deficientes para la citotoxicidad. Por tanto, pudieron identificarse la unión de caseína cinasa IIα a la región alrededor de S473 y la unión de tropomiosina a la región alrededor de T363 de NS1. Análisis de impacto de NS1 en la célula huésped han presentado múltiples efectos, que podían llevar a la citostasis y/o a la inducción de citólisis. Algunos de ellos podrían ser sólo efectos secundarios de

funciones replicativas de NS1, mientras que otros se inducen específicamente para liberar partículas virales de progenie de células infectadas. Las últimas actividades de NS1 son de particular interés para diseñar nuevos fármacos. Además de la parada del ciclo celular en fase S de células infectadas, la expresión de la proteína NS1 sola lleva a drásticos cambios morfológicos (contracción celular), manifestados por una desorganización del citoesqueleto en células susceptibles. Análisis más detallados han demostrado que después de la infección por MVM de células A9 se ven afectados predominantemente filamentos de vimentina y tropomiosina, mientras que los microtúbulos permanecen sin verse afectados, lo que indica un impacto selectivo de la proteína NS1 hacia la célula huésped. En parte, la dinámica de estos filamentos de citoesqueleto parece estar bajo la regulación de PKC, que a su vez se ven desregulados tras la infección por MVM. Sin embargo, lo que es más importante, los filamentos de tropomiosina se ven afectados directamente por la formación de complejo de NS1 con CKIIα. Estas investigaciones llevaron a asumir que la tropomiosina, un componente del citoesqueleto que está sujeto a alteraciones tras la transformación, se selecciona como diana por NS1/CKIIα llevando a la muerte celular y eventualmente la citólisis. En particular, aunque la tropomiosina 2 (TM2) es la diana genuina de CKII$\alpha\beta$ (la holoenzima existente en células eucariotas), la interacción de alta afinidad con NS1 que forma el complejo NS1/CKIIα ya no reconoce TM2 como sustrato pero puede fosforilar TM5, una isoforma de tropomiosina alternativa. En consecuencia la estructura filamentosa de tropomiosina se altera en presencia de la proteína viral.

Como se mencionó anteriormente, en lugar de sus propias funciones enzimáticas, la citólisis inducida por NS1 es más bien dependiente de la formación de un complejo (multi)proteico ensamblado por la proteína viral a través de interacciones proteína/proteína con polipéptidos celulares (pre-existentes). Tales complejos proteicos podrían tener actividades catalíticas completamente diferentes a las de la proteína NS1 purificada como se caracterizaron en exhaustivas investigaciones. Particularmente la interacción de NS1 con la subunidad catalítica de caseína cinasa II propone una variedad de nuevas opciones. De hecho, pudo demostrarse que la caseína cinasa II altera la especificidad de sustrato en presencia de un oligómero de NS1, usando por ejemplo cápsidas vacías de MVM como sustrato, que permanecen sin verse afectadas por el complejo recombinante altamente activo CKIIα/β. Esta observación lleva a la conclusión de que nuevas dianas celulares pueden fosforilarse y regularse por este complejo NS1/CKIIα llevando a la muerte celular y a la citólisis de células susceptibles infectadas por MVM.

Además de la interacción con una cinasa, se ha mostrado que NS1 de MVM también se une a tropomiosina. En fibroblastos los filamentos tropomiosina están asociados con actina filamentosa. Estos filamentos pueden estar compuestos por diferentes isoformas (tropomiosina 1 a 5), que comparten grandes homologías en la estructura primaria. Como parte del citoesqueleto, la tropomiosina también es responsable de la organización intracelular y a pesar de conocerse poco hasta ahora sobre el impacto de la tropomiosina para la organización de rutas de señalización, en analogía a los microtúbulos podrían servir como proteínas de andamiaje que anclan complejos reguladores más grandes en distintas ubicaciones dentro del citoplasma. Con estos antecedentes, la interacción de NS1 con este componente del citoesqueleto podría por una parte ser importante para dirigir el complejo NS1/CKIIα (citotóxico) hacia una ubicación diferenciada dentro de una célula infectada, por otro lado la propia tropomiosina podría ser una diana para la regulación por esta “cinasa novedosa”. De manera interesante, recientemente se obtuvieron evidencias de que la tropomiosina se fosforila de manera diferenciada por CKIIα/β en comparación con NS1/CKIIα *in vitro* y usando líneas celulares que sobreexpresan CKIIα mutante se observó un patrón de fosforilación diferente de tropomiosina en células infectadas. Además, esas líneas celulares mostraron cierta resistencia hacia las alteraciones inducidas por MVM del citoesqueleto y en consecuencia a la destrucción celular en comparación con los fibroblastos parentales A9.

Con respecto a estos resultados, se propuso que el direccionamiento mediado por NS1 de CKIIα a tropomiosina lleva a drásticas alteraciones morfológicas de la célula huésped y eventualmente a la muerte celular, que podría ser un requisito previo para la lisis celular inducida por MVM. Para demostrar esta hipótesis, se generaron constructos que podían dirigir el tipo natural de CKIIα endógena hacia tropomiosina. Estos constructos se sometieron a prueba para determinar su impacto sobre la supervivencia celular y se encontró que podía inducirse citotoxicidad específica por NS1 dirigiendo CKIIα a tropomiosina, es decir que estos constructos son adecuados para terapia génica dirigida, preferentemente terapia contra el cáncer dirigida. Los hallazgos de estos experimentos también sugieren que NS1 (o partes del mismo) median la actividad cinasa de CKII dentro de la célula mediante uno de, (i) direccionamiento de la enzima catalítica dentro de la célula a compartimientos subcelulares apropiados y (ii) mediación de la especificidad de sustrato de esta enzima.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: constructos para someter a prueba supuestas oncotoxínas para determinar sus efectos sobre células huésped

Para detalles, véase el ejemplo 1.

Figura 2: ensayo de toxicidad

Ensayos de inhibición de formación de colonias realizados con los constructos descritos en el ejemplo 1. Para detalles, véase el ejemplo 2.

Figuras 3 a 5: ilustraciones de las posibles propiedades de la invención.

El péptido de la invención es un polipéptido de fusión que combina un sitio de unión para un componente de citoesqueleto (es decir tropomiosina) (es decir sitio de direccionamiento), una proteína efectora, es decir una proteína cinasa, o un sitio de unión para una proteína efectora, es decir, una proteína cinasa (es decir caseína cinasa II; CKIIα) tal como se define en las reivindicaciones. Ya que ambos elementos pueden ser muy cortos (por ejemplo, $CKII_B$ consiste sólo en un decapéptido), los dos elementos pueden separarse por un "péptido de relleno" (por ejemplo, proteína verde fluorescente mejorada; EGFP) para mejorar la accesibilidad de ambos sitios y la estabilidad de la toxina. El péptido puede aplicarse como elemento genético o compuesto y puede/debe albergar elementos reguladores deseados tales como señales para modificaciones postraduccionales (por ejemplo sitios de fosforilación) que alteran la especificidad, péptidos de señalización adicionales (por ejemplo para secreción), y/o señales de degradación que controlan la estabilidad. Para incrementar la especificidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de fusión de la invención puede colocarse bajo el control de promotores constitutivos o inducibles (incluyendo específicos del tejido) y empaquetarse en partículas recombinantes que albergan señales de direccionamiento para una especificidad celular/tisular apropiada.

Por tanto, en una primera realización, la presente invención se refiere a un polipéptido de fusión que comprende (a) un sitio de unión para tropomiosina que comprende los aminoácidos 235-379 de la proteína NS1 de parvovirus y (b_1) caseína cinasa II (CKIIα) o el dominio catalítico de la misma, o (b_2) un fragmento de CKIIβ que comprende un sitio de unión para CKIIα.

Secuencias que corresponden a las partes (a) y (b) que difieren de las secuencias de tipo natural, por ejemplo, mediante eliminación/eliminaciones, sustitución/sustituciones y/o adición/adiciones de aminoácidos codifican para péptidos que exhiben actividades biológicas nuevas o mejoradas, por ejemplo, una unión mejorada de un componente de citoesqueleto.

Ambas partes (a) y (b) están preferentemente unidas por enlace covalente. Alternativamente, son posibles otras interacciones no covalentes entre los dos elementos (a) y (b). La orientación entre los dos elementos (a) y (b) es intercambiable. Preferiblemente, la parte (a) forma la parte N terminal del polipéptido de fusión.

En una realización preferida, ambas partes (a) y (b) de dicha proteína de fusión están unidas por un ligador (poli)peptídico adecuado, por ejemplo, que garantiza (i) que las partes (a) y (b) pueden interaccionar con sus parejas y/o (ii) que el polipéptido de fusión tiene suficiente estabilidad. El experto en la técnica conoce ligadores (poli)peptídicos adecuados y pueden variar considerablemente en longitud. Ejemplos de ligadores (poli)peptídicos adecuados son EGFP, u otras proteínas solubles inertes tales como croE, que generalmente se usan para estabilizar péptidos para propósitos de inmunización. Alternativamente, pequeños tramos de polipéptidos al azar pueden ser suficientes para separar los dos elementos (a) y (b).

Pudieron mostrarse los drásticos efectos de direccionamiento de la subunidad catalítica de caseína cinasa II, CKIIα hacia la tropomiosina; véase el ejemplo 2. De manera similar, ya que otros filamentos de citoesqueleto y/o nucleares están sujetos a regulación de sus propiedades de polimerización y despolimerización, es posible diseñar otros polipéptidos de fusión (toxinas) análogos al polipéptido de fusión del ejemplo 1 que contienen proteínas efectoras alternativas o sitios de unión de las mismas (por ejemplo otras proteína cinasas, fosfatasas, enzimas que ejercen otras modificaciones postraduccionales), que pueden desestabilizar o estabilizar el citoesqueleto o la lámina nuclear de acuerdo a los efectos deseados. Estos efectores pueden o bien dirigirse a tropomiosina o bien alternativamente a otros filamentos, láminas y/o componentes reguladores de citoesqueleto implicados en la polimerización/despolimerización de los filamentos, tales como cofilina o profilina. La última parece estar implicada en la actividad de polimerización de tropomiosina y está sujeta a regulación mediante PKCλ, que está sujeto a regulación mediante proteína NS1 de MVM. Ambos efectos, el direccionamiento de CKIIα hacia tropomiosina que lleva a la reestructuración de la tropomiosina y la reducción de la actividad de polimerización mediante PKCλ/profilina a través de NS1 pueden dañar la célula huésped y en consecuencia inducir muerte celular. Por tanto, puede esperarse que el principio de la presente invención sea útil para inducir la destrucción (o reorganización) del citoesqueleto seleccionando como diana componentes alternativos (véase la figura 5).

Por tanto, los componentes de citoesqueleto útiles para la unión por el polipéptido de fusión de la invención comprenden la tropomiosina. Recientes investigaciones han demostrado que la tropomiosina no es la única diana (celular) de CKIIα que está sujeta a fosforilación diferencial en presencia de NS1. Así, se identificó particularmente la gelsolina, una proteína de corte de actina (modulador de filamentos de actina) cuyo patrón de fosforilación se ve alterado por la formación de complejo de NS1 con CKIIα, y tubulina. Además, se encontró que proteínas NS2 virales podían ser candidatos adicionales para una fosforilación alterada de CKIIα mediante interacción con NS1. Teniendo en cuenta que las cápsidas de MVM se convierten en sustratos para CKIIα en presencia de NS1 puede esperarse que la interacción de NS1 sea un elemento clave para las actividades oncolíticas inducidas por MVM. Esta conclusión está respaldada por los hallazgos de que líneas celulares que expresan una forma mutante negativa dominante de CKIIα se vuelven altamente resistentes a los efectos citopáticos inducidos por el virus.

Las proteínas efectoras útiles para el polipéptido de fusión de la invención comprenden caseína cinasa (CKIIα).

En el polipéptido de fusión de la invención, el sitio de unión a tropomiosina se deriva de NS1 de parvovirus. Otros sitios de unión a tropomiosina tal como se describe son la región de unión a tropomiosina de TnT, o la de subunidad de unión a tropomiosina de troponina.

Según la presente invención, el sitio de unión para el componente de citoesqueleto comprende la secuencia de aminoácidos desde las posiciones 235 hasta 379 de NS1 (Astell *et al.*, 1983, Nucl. Acids Res. 11, 999-1018).

Se prefiere particularmente un polipéptido de fusión de la invención, en el que la parte (b) es un sitio de unión para caseína cinasa II (CKIIα) que comprende la secuencia de aminoácidos DLEPDEELED.

Para mejorar la especificidad del polipéptido de fusión de la invención como toxina, por ejemplo, para células transformadas de manera neoplásica, podría ser deseable incluir características reguladoras. En los experimentos mostrados en los ejemplos 1 y 2, el dominio de interacción de NS1 con tropomiosina contiene sitios de fosforilación de PKC, de los que T363 tras mutagénesis en alanina destruye la unión a TM y en consecuencia reduce el potencial tóxico de NS1. Asimismo el otro dominio de NS1 que interacciona con CKIIα se fosforila por PKCλ en dos aminoácidos T435 y S473, que parecen ser cruciales para que NS1 induzca alteraciones morfológicas. Los mutantes de NS1, que eliminan la interacción con CKIIα se toleran bastante bien por la célula huésped en comparación con el polipéptido de tipo natural. Ya que los miembros de la familia PKC a menudo se regulan por incremento tras la transformación, parece posible que la interacción dependiente de la fosforilación con las proteínas celulares apropiadas es una característica de la actividad oncolítica de parvovirus autónomos. Por tanto, al polipéptido de fusión de la invención se le pueden atribuir ésta o características similares para hacer que el sitio de interacción sea específico del tipo celular, particularmente para células transformadas. Tales señales pueden consistir en sitios de fosforilación específicos para cinasas diana, pero también para señales de acetilación, metilación, miristilación, palmitilación u otras señales de modificaciones postraduccionales. Además, el polipéptido de fusión de la invención puede contener señales, que inducen cambios conformacionales para exponer los sitios de interacción tras una señal deseada, análoga a la cascada de activación de la proteína cinasa C, o puede contener una señal de direccionamiento y/o anclaje o secreción adicional, tal como NLS, NES, dominios transmembrana, etc. (figura 4).

Por tanto, puede haber modificaciones presentes en las partes (a) y/o (b) de la proteína de fusión tal como se describe, que inducen o mejoran cambios morfológicos de la célula huésped.

El polipéptido de fusión de la invención puede usarse directamente o puede suministrarse a las células mediante expresión intracelular y posterior secreción. Por tanto, la presente invención también se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido de fusión de la invención así como a un vector recombinante que contiene dicha secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente, los vectores recombinantes son plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos, células, y otros vectores habitualmente usados en el campo de la ingeniería genética. Los vectores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan al vector de expresión basado en CMV para su expresión en células de mamífero y vectores derivados de baculovirus para su expresión en células de insecto. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de la invención está operativamente unida a los elementos reguladores en el vector recombinante de la invención que garantizan la transcripción y la síntesis de un ARNm en células procariotas y/o eucariotas que puede traducirse. La secuencia de nucleótidos que va a transcribirse puede estar operativamente unida a un promotor como un promotor de T7, metalotioneína I, polihedrina o temprano de CMV.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a células huésped recombinantes que contienen de manera transitoria o estable las secuencias de ácido nucleico o los vectores de la invención. Se entiende que una célula huésped es un organismo que puede captar ADN recombinante *in vitro* y, dado el caso, sintetizar los polipéptidos de fusión codificados por las moléculas de ácido nucleico de la invención. Preferiblemente, estas células son células procariotas o eucariotas, por ejemplo células de mamífero, células bacterianas, células de insecto o células de levadura.

En el presente documento también se describe un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de fusión de la invención. El término “anticuerpo”, preferiblemente, se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos monoclonales combinados con diferentes especificidades epitópicas, como también preparaciones de anticuerpos monoclonales diferenciados. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de un antígeno que contiene (fragmentos de) los polipéptidos de la invención mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Köhler *et al.*, Nature 256 (1975), 495). Tal como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión “anticuerpo” (Ac) o “anticuerpo monoclonal” (AcM) incluya moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab’)2) que pueden unirse específicamente a proteína. Los fragmentos Fab y f(ab’)2 carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión a tejido no específica que un anticuerpo intacto. (Wahl *et al.*, J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983)). Por tanto, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una FAB u otra biblioteca de expresión de inmunoglobulina. Además, los anticuerpos incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados.

Para ciertos propósitos, por ejemplo métodos de diagnóstico o para someter a ensayo la semivida o el aclaramiento del polipéptido de fusión dentro de un organismo, el anticuerpo puede marcarse de manera detectable, por ejemplo, con un

radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelante de metal, o una enzima.

La invención también se refiere a animales no humanos transgénicos, es decir ratón, ratas, hámsteres, perros, conejos, cerdos, *C. elegans* y peces transgénicos tales como el pez torpedo que comprende una molécula de ácido nucleico o vector de la invención, preferiblemente en el que dicha molécula de ácido nucleico o vector está integrado de manera estable dentro del genoma de dicho animal no humano, preferiblemente tal que la presencia de dicha molécula de ácido nucleico o vector lleva a la expresión de un polipéptido de fusión de la invención. Dicho animal puede tener una o varias copias de las mismas o diferentes moléculas de ácido nucleico que codifican para una o varias formas de dicho polipéptido de fusión. Este animal tiene numerosas utilidades, incluyendo como modelo de investigación para el desarrollo/progresión de carcinomas y por tanto, presenta un animal novedoso y valioso en el desarrollo de terapias, tratamiento, etc. para carcinomas. Por consiguiente, en este caso, el mamífero no humano es preferiblemente un animal de laboratorio tal como un ratón o una rata. También puede ser deseable inactivar la expresión o función del polipéptido de fusión en una determinada fase de desarrollo y/o la vida del animal transgénico. Esto puede lograrse usando, por ejemplo, promotores específicos de tejido, regulados por células y/o desarrollo y/o inducibles que accionan la expresión de, por ejemplo, una molécula antisentido o ribozima dirigida contra el transcrito de ARN que codifica para el polipéptido de fusión. Un sistema inducible adecuado es por ejemplo la expresión génica regulada por tetraciclina tal como se describe, por ejemplo, por Gossen y Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 USA (1992), 5547-5551) y Gossen *et al.* (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62).

Los métodos para la producción de un animal transgénico no humano de la presente invención, preferiblemente ratón transgénico, se conocen bien por el experto en la técnica. Tales métodos, por ejemplo, comprenden la introducción de una secuencia de ácido nucleico o vector de la invención dentro de una célula germinal, una célula embrionaria, célula madre o un óvulo o una célula derivada del mismo. La producción embriones transgénicos y la selección de aquellos pueden realizarse, por ejemplo, tal como se describe por A. L. Joyner Ed., Gene Targeting, A Practical Approach (1993), Oxford University Press. El ADN de las membranas embrionarias de los embriones puede analizarse usando, por ejemplo, transferencias de tipo Southern con una sonda apropiada.

Debido a la citotoxicidad intrínseca del polipéptido de fusión de la invención dirigido a células transformadas, puede usarse como oncotoxina. El polipéptido de fusión puede dirigir proteínas efectoras (enzimas celulares modificadoras) a dianas diferenciadas dentro de la célula para destruir o al menos inhibir la proliferación. Sin embargo, diseñado en los ejemplos para destruir específicamente las células cancerosas, el polipéptido de fusión de la invención tiene un campo de acción más amplio. Particularmente, además de las células transformadas, pueden seleccionarse como diana otras poblaciones celulares aberrantes (por ejemplo células infectadas por VIH) y destruirse de una forma similar, considerando que puede proporcionarse la especificidad o al menos mejorarse en comparación con la población sana. El polipéptido de fusión de la invención tiene varias ventajas. Como elemento genético, puede lograrse la especificidad mediante expresión génica y genética dirigida. Además, tal como se muestra a modo de ejemplo con la proteína NS1 de parvovirus, los sitios de unión y la ubicación dentro de la célula pueden estar sujetos además a regulación para lograr una destrucción celular eficaz en el entorno deseado. Por último pero no menos importante, también es posible aplicar el polipéptido de fusión de la invención directamente como compuesto al que se le atribuyen las características apropiadas. El tratamiento puede administrarse a cultivos celulares u organismos portadores de enfermedades.

Por tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de fusión, secuencia de ácido nucleico o vector recombinante de la invención y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se define en las reivindicaciones. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados, etc. se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. La administración de composiciones adecuadas puede realizarse de diferentes formas, por ejemplo mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende de la naturaleza de la enfermedad, su ubicación y el tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación se determinará por el médico encargado y otros factores clínicos. Tal como se conoce bien en la técnica de la medicina, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular que va a administrarse, el tiempo y la vía de administración, el tipo y la fase de una enfermedad, la salud general y otros fármacos que están administrándose concurrentemente.

El suministro de las secuencias de ácido nucleico de la invención puede lograrse mediante aplicación directa o, preferiblemente, usando un vector de expresión recombinante tal como un virus quimérico que contiene estos compuestos o un sistema de dispersión coloidal. La aplicación directa al sitio diana puede realizarse, por ejemplo, mediante suministro balístico, como sistema de dispersión coloidal o mediante catéter a un sitio en arteria. Los sistemas de dispersión coloidal que pueden usarse para el suministro de las secuencias de ácido nucleico anteriores incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua (mezcladas), micelas, liposomas y lipoplexos. El sistema coloidal preferido es un liposoma. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos y esteroides, especialmente colesterol. El experto está en posición para seleccionar tales liposomas que son adecuados para el suministro de la secuencia de

ácido nucleico deseada. Pueden usarse liposomas específicos de órgano o específicos de célula para lograr el suministro sólo al tejido deseado. El direccionamiento de liposomas puede llevarse a cabo por el experto en la técnica mediante aplicación de métodos comúnmente conocidos. Este direccionamiento incluye direccionamiento pasivo (usando la tendencia natural de los liposomas para distribuirse a células del RES en órganos que contienen capilares sinusoidales) o direccionamiento activo (por ejemplo mediante acoplamiento del liposoma a un ligando específico, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor, azúcar, glicolípido, proteína, etc., mediante métodos bien conocidos). Pueden usarse preferiblemente anticuerpos monoclonales para dirigir liposomas a tejidos específicos, por ejemplo, tumores, mediante ligandos de superficie celular específicos.

Vectores recombinantes preferidos útiles para la terapia génica son vectores virales, por ejemplo adenovirus, herpesvirus, virus vaccinia, virus del sarampión, el parvovirus, o un virus de ARN tal como un retrovirus. Incluso más preferiblemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Ejemplos de tales vectores retrovirales que pueden usarse en la presente invención son: virus de la leucemia murina de Moloney (VLMM), virus del sarcoma murino de Harvey (VSMH), virus del tumor de mama murino (VTMM) y el virus del sarcoma de Rous (VSR). Lo más preferiblemente, se emplea un vector retroviral de primate no humano, tal como el virus de la leucemia del gibón (VLG), proporcionando una gama más amplia de huéspedes en comparación con vectores murinos. Ya que los retrovirus recombinantes son deficientes, se requiere ayuda para producir partículas infecciosas. Tal ayuda puede proporcionarse, por ejemplo, usando líneas de células cooperadoras que contienen plásmidos que codifican para todos los genes estructurales de los retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras dentro de LTR. Los expertos en la técnica conocen bien líneas de células cooperadoras adecuadas. Dichos vectores pueden contener adicionalmente un gen que codifica para un marcador seleccionable de manera que pueden identificarse las células transducidas. Además, los vectores retrovirales pueden modificarse de tal forma que se vuelven más específicos de diana. Esto puede lograrse, por ejemplo, insertando un polinucleótido que codifica para un azúcar, un glicolípido o una proteína, preferiblemente un anticuerpo. Los expertos en la técnica conocen métodos adicionales para generar vectores específicos de diana. Vectores adecuados adicionales y métodos para terapia génica *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y los conocen los expertos en la técnica; véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/29469 o WO 97/00957.

Para lograr la expresión sólo en el órgano diana, por ejemplo, un tumor que va a tratarse, las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden unirse a un promotor específico de tejido y usarse para terapia génica. Los expertos en la técnica conocen bien tales promotores (véase por ejemplo Zimmermann *et al.*, (1994) Neuron 12, 11-24; Vidal *et al.*; (1990) EMBO J. 9, 833-840; Mayford *et al.*, (1995), Cell 81, 891-904; Pinkert *et al.*, (1987) Genes & Dev. 1, 268-76). Para el tratamiento de un cáncer de colon, se prefiere el uso del promotor específico de la ruta wnt (Korinek *et al.*, 1997, Science 275, 1784-1787), para el tratamiento del VIH el uso de un elemento sensible a tat. Además, dependiendo de las necesidades particulares pueden usarse elementos promotores/potenciadores recientemente diseñados o disponibles alternativos para accionar la expresión de la secuencia de ácido nucleico de la invención.

La presente invención también se refiere al uso de los compuestos anteriores de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada con la presencia de una población celular aberrante. Las enfermedades preferidas son el cáncer y el SIDA. Otras enfermedades pueden incluir las enfermedades genéticas que alteran la estructura celular tales como el síndrome Wiscott-Aldrich, la fibrosis quística, o enfermedades virales crónicas tales como la hepatitis B y la hepatitis C.

Finalmente, la presente invención también se refiere al direccionamiento y a la mediación de la proteína efectora, es decir, la (actividad) CKIIα por la proteína NS1 o partes submoleculares que comprenden los aminoácidos 235-379 de la proteína NS1, a proteínas celulares candidatas tales como la tropomiosina, la tubulina y la gelsolina.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Generación de constructos de polipéptidos de fusión para someter a prueba supuestas oncotoxinas para determinar sus efectos sobre células de mamífero

Dada la suposición de que NS1 funciona como proteína de andamiaje, que conecta la subunidad catalítica de caseína cinasa II (CKIIα) a la tropomiosina, se diseñaron péptidos artificiales que albergan la región de unión a tropomiosina de NS1 de MVM y que conectan o bien CKIIα (o variantes de la misma) o bien sólo un sitio de unión a CKIIα conocido (figura 1). Fragmentos derivados de PCR compuestos por un sitio de unión a tropomiosina (TM_B) derivado de la proteína NS1 de parvovirus MVMp (aminoácidos 235 a 379), el polipéptido estabilizador EGFP derivado de pEGFP (Becton Dickinson, Heidelberg), y o bien un sitio de unión a caseína cinasa IIα (derivado de CKIIβ: DLEPDEELED) o la subunidad catalítica funcional de caseína cinasa II CKIIα (NCBI L15618) aislada de la línea celular de fibroblasto de ratón A9 ($CKII_B$) se clonaron directamente dentro de pCR3.1 (Invitrogen, Karlsruhe), debido a las proyecciones de 3'adenosintrifosfato generadas por la Taq polimerasa (véase el anexo 1). La EGFP, una proteína tolerada en células eucariotas, sirve como espaciador y para estabilizar el polipéptido de fusión. Entonces se transfectaron los constructos de plásmido en células eucariotas A9, HEK 293 y se expresaron las proteínas efectoras bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (P_{CMV}). Además, los constructos contienen un gen de resistencia a la neomicina bajo el control del promotor/potenciador del SV40 ($P_{SV40/ori}$), que permite seleccionar células transfectadas por su resistencia

lograda frente al fármaco G418. Los fragmentos de PCR que albergan las propiedades deseadas se ligan directamente a los vectores pCR3.1 linealizados, que contienen proyecciones T 3'-terminales según las sugerencias del fabricante (Invitrogen, Karlsruhe). Estos plásmidos de expresión permiten determinar la toxicidad de un gen apropiado mediante ensayos de inhibición de formación de colonias usando líneas celulares sensibles a G418.

Los siguientes constructos efectores se generaron y analizaron para determinar su impacto sobre la inhibición de formación de colonias: TM_B-CKIIα (la subunidad catalítica de caseína cinasa II (CKIIα) unida al sitio de unión a tropomiosina (derivado de la proteína NS1 de parvovirus MVM) separada por GFP)) y TM_B-$CKII_B$ (un constructo adaptador que alberga los sitios de unión para tropomiosina así como un sitio de unión a caseína cinasa II (CKIIα)). Los dos sitios de unión están fusionados a la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Como controles negativos, se generaron los siguientes constructos pseudoefectores: GFP-CKIIα (caseína cinasa IIα unida a GFP sin un sitio de unión a tropomiosina), TM_B-E81A (sitio de unión a tropomiosina unido mediante GFP a una caseína cinasa IIα inactiva catalítica), TM_B-GFP (sitio de unión a tropomiosina de NS1 unido a GFP sin CKIIα o $CKII_B$).

Ejemplo 2

Ensayos de toxicidad

Se realizaron ensayos de inhibición de formación de colonias con los constructos descritos en el ejemplo 1. Se transfectaron células A9 o HEK293 ($2x10^5$ células por 25 cm^2) con 10 μg de ADN de plásmido usando 25 μl de lipofectamina en DMEM sin suero según las condiciones del fabricante (Invitrogen). Después de una incubación de 5 h se sustituyó el medio de transfección por DMEM que contenía el 10% de FBS y se dejaron crecer las células durante 48 h adicionales en ausencia de G418 antes de subdividirlas en placas de 150 cm^2 en las que se seleccionaron células transfectadas mediante adición de 400 μg/ml de G418 (SIGMA, Taufkirchen). Se fijaron las colonias en crecimiento y se tiñeron según McCoy después de un crecimiento de dos a tres semanas bajo presión selectiva. En la figura 2a y la figura 2b se muestran dos experimentos representativos. Aunque la expresión de las dos proteínas efectoras (TM_B=CKIIα (figura 2a) y TM_B=$CKII_B$ (figura 2b)) permitió generar sólo unas pocas colonias en células A9 en comparación con los péptidos control, se generaron transfectantes casi similares en líneas de células HEK293 de pase bajo, reflejando la toxicidad selectiva del polipéptido de fusión de la invención.

Por tanto, en presencia de la toxina diseñada (por ejemplo TM_B-GFP-CKIIα o TM_B-GFP-$CKII_B$), no pudo obtenerse casi ninguna colonia después de la transfección de la línea celular A9 de fibroblasto susceptible a MVM, mientras que las transfecciones de los plásmidos que expresaban los péptidos control (péptidos que no conectan CKIIα) generaron >2000 de colonias bajo selección con G418. Debe mencionarse que todas las transfecciones proporcionaron células verdes fluorescentes 2 días posteriores a la transfección, lo que sugiere que las proteínas realmente se expresaron durante un cierto periodo. De manera interesante, con TM_B-GFP-$CKII_B$ se obtuvieron significativamente menos colonias que con GFP-$NS1_{wt}$ (datos no mostrados), lo que sugiere que en ausencia de elementos reguladores adicionales presentes dentro de la secuencia que codifica para NS1, la toxina recién diseñada es más eficaz que la proteína viral original. A diferencia de las células A9 susceptibles, la transfección de los constructos efectores TM_B-CKIIα o TM_B-GFP-$CKII_B$ produjo casi las mismas cantidades de colonias en células HEK293, lo que demuestra que las toxinas recién diseñadas ejercen la especificidad de tipo de célula.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de fusión que comprende (a) un sitio de unión para la tropomiosina que comprende los aminoácidos 235-379 de la proteína NS1 de parvovirus y (b_1) caseína cinasa II (CKIIα) o el dominio catalítico de la misma, o (b_2) un fragmento de CKIIβ que comprende un sitio de unión para CKIIα.

2. Polipéptido de fusión según la reivindicación 1, en el que ambas partes (a) y (b) del polipéptido de fusión están unidas por un ligador peptídico.

3. Polipéptido de fusión según la reivindicación 2, en el que dicho ligador peptídico es EGFP.

4. Polipéptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sitio de unión (b_2) para la caseína cinasa II (CKIIα) comprende la secuencia de aminoácidos DLEPDEELED.

5. Secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Vector recombinante que contiene la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5.

7. Vector recombinante según la reivindicación 6, en el que la secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a elementos reguladores que permiten la transcripción y síntesis de un ARN traducible en células huésped procariotas y/o eucariotas.

8. Célula huésped recombinante que contiene el vector recombinante según la reivindicación 6 ó 7.

9. Célula huésped recombinante según la reivindicación 8, que es una célula de mamífero, una célula bacteriana, una célula de insecto o una célula de levadura.

10. Animal transgénico no humano que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5 o el vector recombinante según la reivindicación 6 ó 7, siendo dicho animal un ratón, rata, hámster, perro, conejo, cerdo, *C. elegans* o pez transgénico.

11. Composición farmacéutica que contiene el polipéptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5 o el vector recombinante según la reivindicación 6 ó 7.

12. Uso del polipéptido de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5 o el vector recombinante según la reivindicación 6 ó 7 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada con la presencia de una población celular aberrante.

13. Uso según la reivindicación 12, en el que dicha enfermedad es cáncer o SIDA.

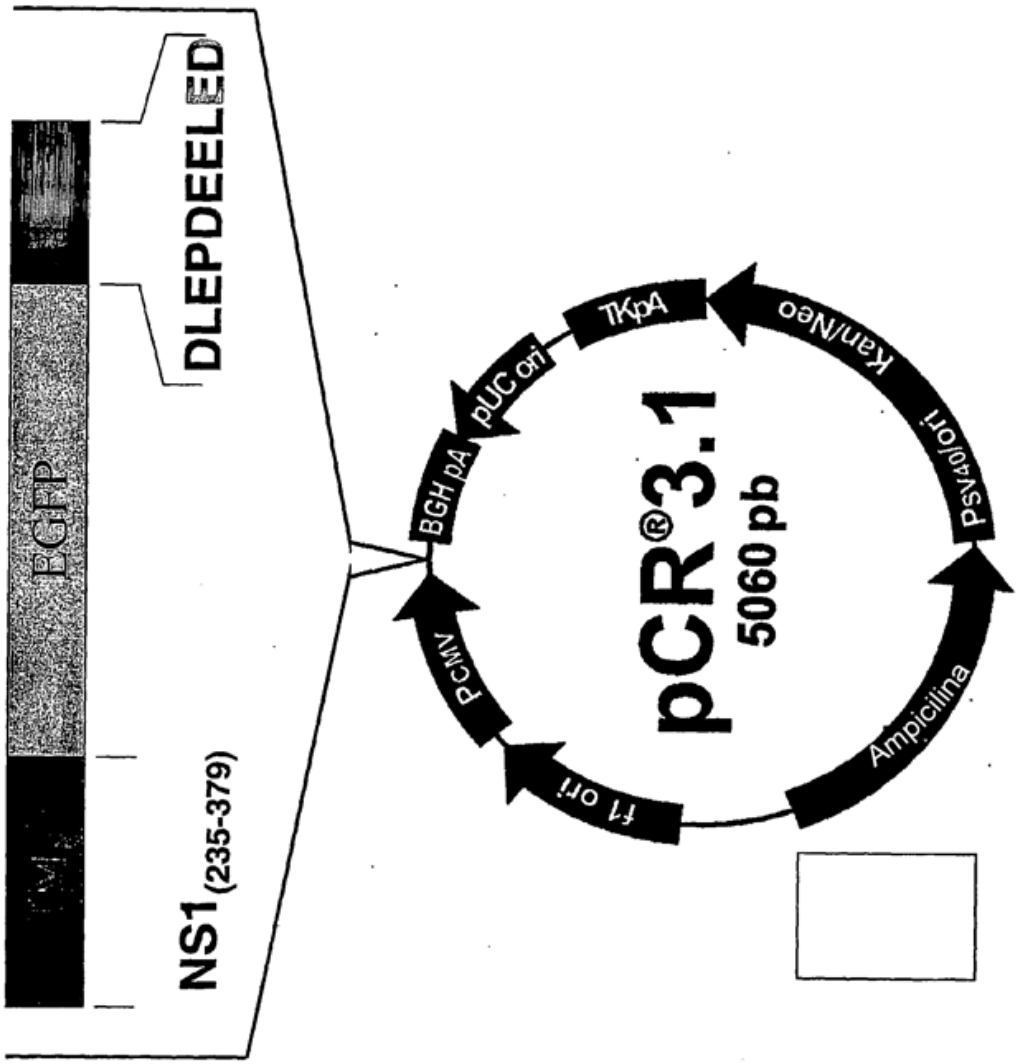
DLEPDEELED
EGFP
NS1(235-379)
pCR®3.1
5060 pb
TKpA
Kan/Neo
PSV40/ori
Ampicilina
f1 ori
PCMV
BGH pA
pUC ori

FIG.1

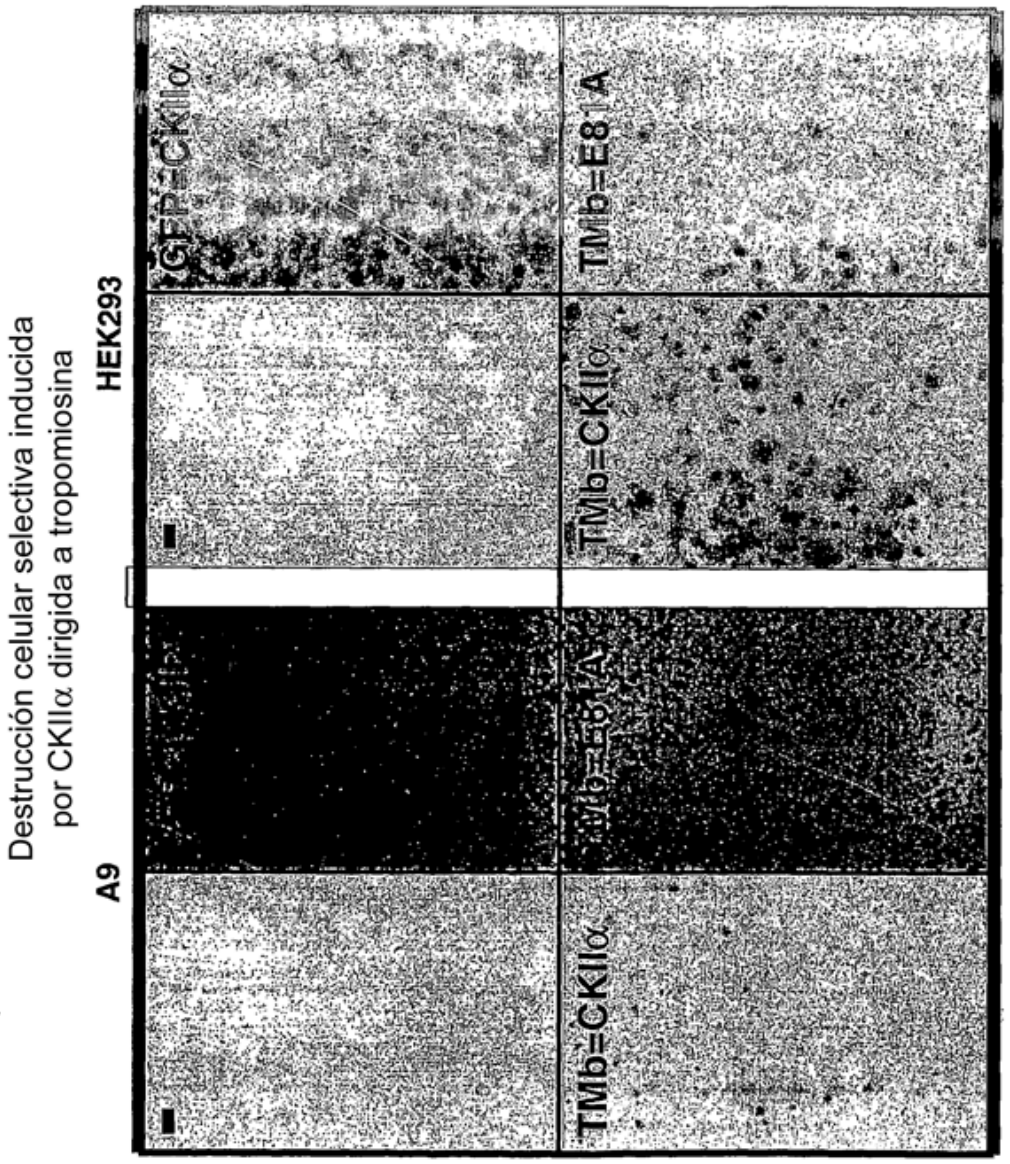
Destrucción celular selectiva inducida
por CKIIα dirigida a tropomiosina
A9
HEK293
TMb=CKIIα
TMb=E81A
TMb=CKIIα
GFP-CKIIα
TMb=E81A

FIG.2a

La proteína adaptora tropomiosina/CKIIα induce destrucción celular selectiva

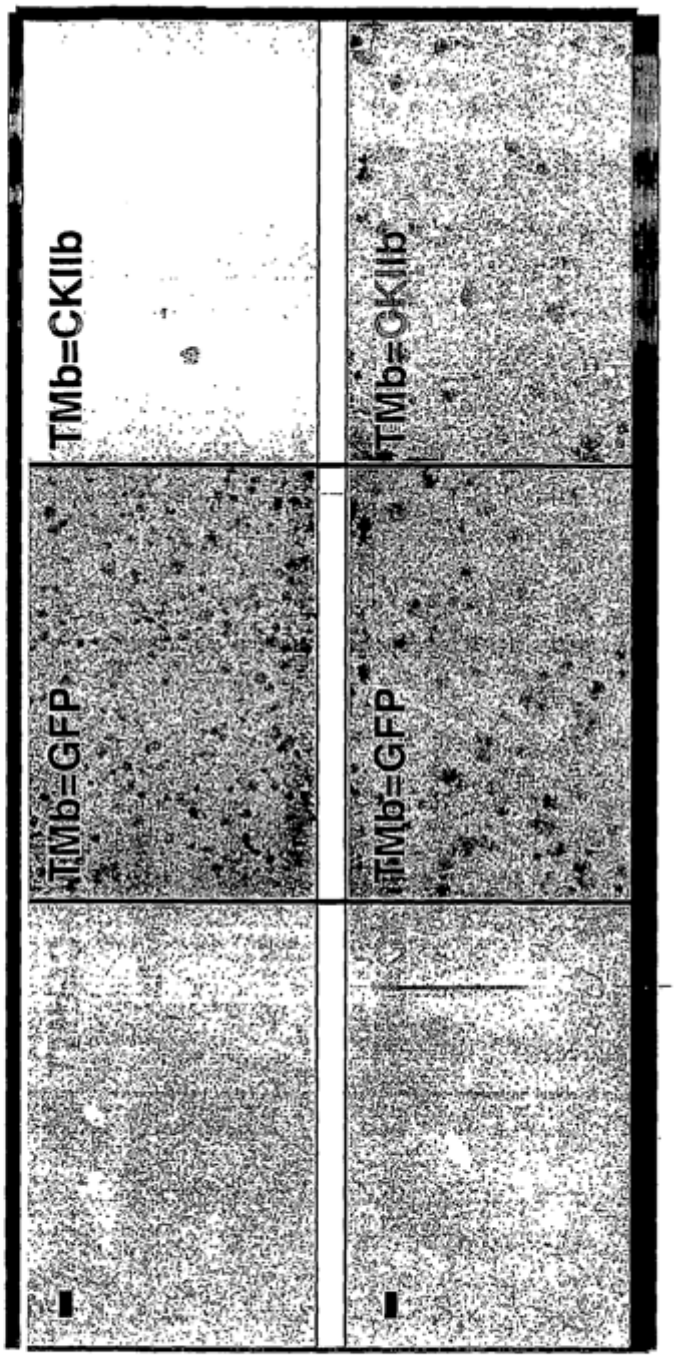

FIG.2b

FIG.3

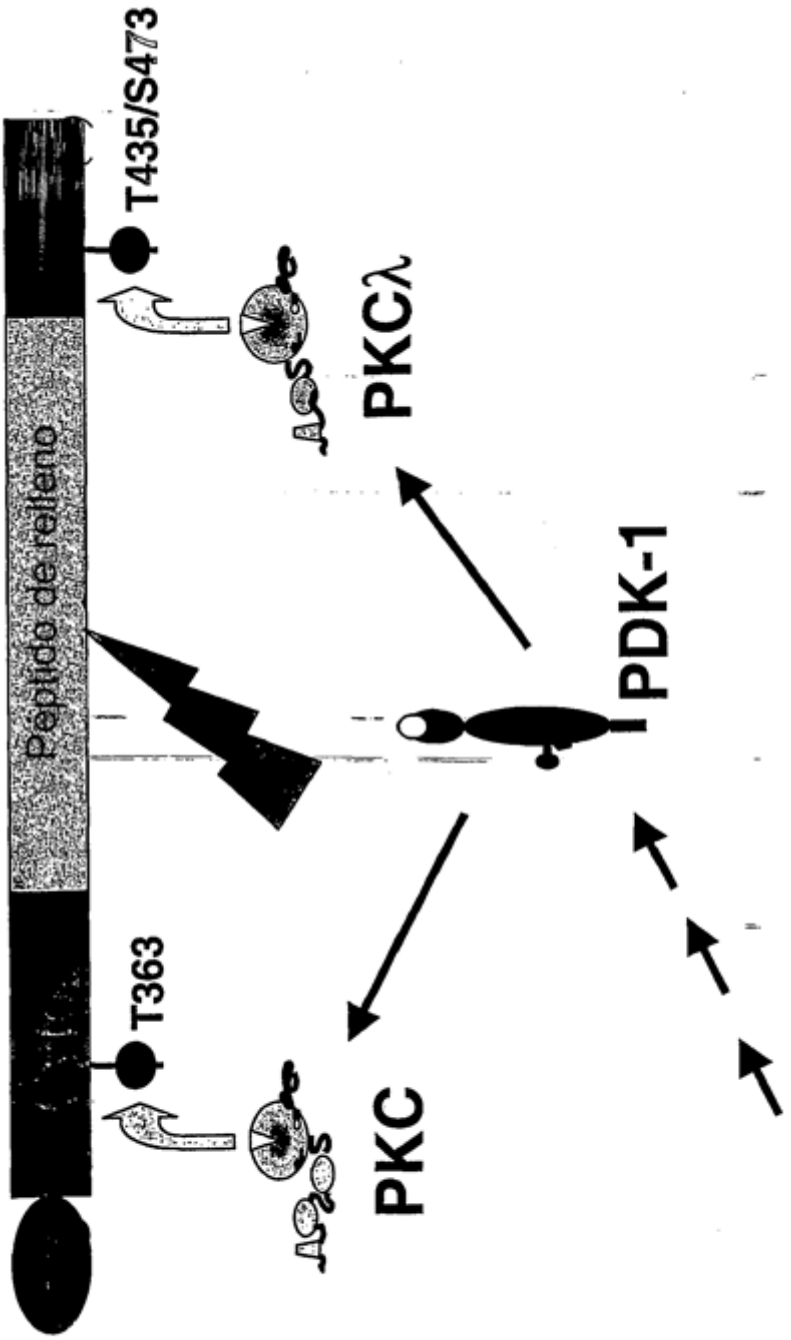

FIG.4

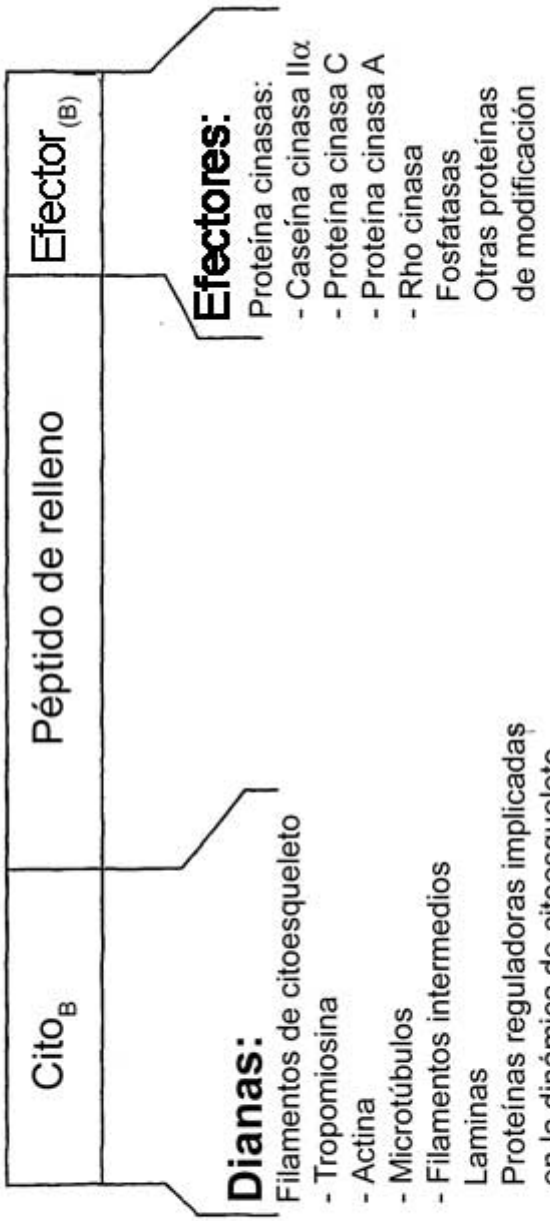
Cito$_B$
Péptido de relleno
Efector$_{(B)}$
Dianas:
Filamentos de citoesqueleto
- Tropomiosina
- Actina
- Microtúbulos
- Filamentos intermedios
Laminas
Proteínas reguladoras implicadas en la dinámica de citoesqueleto
Efectores:
Proteína cinasas:
- Caseína cinasa IIα
- Proteína cinasa C
- Proteína cinasa A
- Rho cinasa
Fosfatasas
Otras proteínas de modificación

FIG.5