

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 301**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2001 E 01985065 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1343532**

54 Título: **Transferencia de gen mediada por vector lentiviral y usos de la misma**

30 Prioridad:

19.12.2000 US 256701 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.09.2013

73 Titular/es:

**RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION
(100.0%)
402 NORTH DIVISION STREET
CARSON CITY, NEVADA 89703, US**

72 Inventor/es:

**STOUT, J. TIMOTHY y
APPUKUTTAN, BINOY**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 422 301 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

Transferencia de gen mediada por vector lentiviral y usos de la misma

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular de vectores y terapia de gen. Más específicamente, la presente invención se refiere a la utilización de vectores lentivirales en terapia de gen humana para la enfermedad ocular heredada y proliferativa.

Descripción de la técnica relacionada

15 Una de las causas más comunes de ceguera humana es la proliferación celular anormal intraocular que con frecuencia da como resultado una pérdida de claridad del eje visual, o una separación de la retina del epitelio de segmento retinal (RPE) debido a las fuerzas de tracción aplicadas directamente a la superficie retinal. El desprendimiento retinal proliferativo, si está relacionado con enfermedad diabética proliferativa (PDR), retinopatía de prematuridad (ROP), vitreoretinopatía proliferativa (PVR), o degeneración macular neovascular relacionada con la edad (AMD), si se deja sin tratar, da como resulta último una pérdida permanente de la visión.

20 La proliferación anormal de nuevos vasos sanguíneos en el interior del ojo, o neovascularización ocular, es la causa más común de ceguera permanente en los países desarrollados. Tres enfermedades están asociadas a la inmensa mayoría de casos de neovascularización intraocular: diabetes, retinopatía de prematuridad y degeneración macular relacionada con la edad. Aunque estas tres entidades clínicas son distintas y afectan a diferentes conjuntos de pacientes, comparten un recorrido final común que incluye la división incontrolada de células endoteliales que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos que comprometen finalmente la función retinal. En conjunto, estas condiciones suponen aproximadamente el 60% de la ceguera intratable en los Estados Unidos.

25 La proliferación de células endoteliales vasculares en el interior de la retina inicia el proceso de retinopatía diabética proliferativa (PDR). Si no se trata, estas células endoteliales siguen dividiéndose y eventualmente forman membranas fibrovasculares que se extienden a lo largo de la superficie interna de la retina o por la cavidad vítrea. La contracción de la superficie vítrea posterior da como resultado una tracción en los sitios de las adhesiones vítreo-fibrovasculares y finalmente se desprende la retina. Aproximadamente el 50% de los diabéticos de Tipo 1 desarrollarán retinopatía diabética proliferativa dentro de los 20 años siguientes a la diagnosis de la diabetes, mientras que el 10% de los pacientes con diabetes de Tipo 2 evidenciarán retinopatía diabética proliferativa en una franja de tiempo similar.

30 Los vasos sanguíneos se desarrollan habitualmente mediante uno de dos procesos: vasculogénesis o angiogénesis. Durante la vasculogénesis, se establece una red primitiva de capilares durante la embriogénesis en virtud de la maduración de precursores mesenquimales multipotenciales. Por el contrario, la angiogénesis se refiere a un proceso de remodelación que incluye los vasos preexistentes. En angiogénesis, emanan brotes vasculares nuevos a partir de los vasos ya establecidos, más antiguos, e invaden el tejido circundante. En la retina, una vez que se ha establecido la red vascular normal, la remodelación de esta red está en gran medida bajo la influencia de la concentración de oxígeno del tejido; la hipoxia, o escasez de oxígeno, estimula la angiogénesis. Este proceso es el que da como resultado la ceguera en millones de diabéticos, niños prematuros o en la sociedad de mayor edad.

35 Las enfermedades intraoculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética proliferativa, la retinopatía de prematuridad, el glaucoma, y la vitreoretinopatía proliferativa, están por tanto caracterizados por la proliferación anormal o por otros estados para los que la terapia de gen puede ser útil. Ha sido difícil, sin embargo, realizar transducción de gen en células de mamífero con un alto grado de efectividad. Adicionalmente, se ha visto que los resultados con vectores tradicionales tales como los vectores adenovirales, los reactivos a base de liposomas y de dendrímeros, son completamente transitorios. También es problemático introducir estos vectores en el ojo sin la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria.

40 De ese modo, la técnica anterior es deficiente en cuanto a la carencia de medios para transducir células humanas terminalmente diferenciadas o proliferantes en el interior del, o derivadas del ojo. La presente invención cumple esta permanente necesidad y deseo del estado actual de la técnica.

60 Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención consiste en desarrollar vectores lentivirales y métodos de uso de esos vectores en terapia de gen humana para la enfermedad ocular heredada y proliferativa. La utilidad de los vectores lentivirales ha sido descrita en relación con la transducción de células humanas de retina, de córnea, endoteliales vasculares, vitreoretinopáticas proliferativas y epiteliales de pigmento retinal.

En una realización de la presente invención, el potencial de supresión de la división celular intraocular mediante gen de retinoblastoma (Ca-rb) constitutivamente activo (mutante o variante) lentiviral suministrado, ha quedado demostrado. Las células oculares humanas fueron probadas *in vitro*, y dos modelos de enfermedad proliferativa intraocular (vitreo-retinopatía proliferativa y opacificación capsular posterior de extracción post-lente) fueron probados *in vivo*. Una inhibición significativa y de larga duración de la división celular *in vitro* fue observada en muchos tipos diferentes de células. La reducción de la severidad de la vitreo-retinopatía proliferativa y de la opacificación posterior de extracción post-lente, fue observada *in vivo*.

En otra realización de la presente invención, se ha demostrado que la transferencia de genes mediada por lentivirus que se sabe que es importante en el desarrollo y la inhibición del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis o de la muerte celular pre-programada (apoptosis)) podía ser útil en el tratamiento de angiogénesis ocular patológica (por ejemplo, retinopatía diabética o degeneración macular “húmeda” relacionada con la edad) o la muerte celular patológica (por ejemplo, degeneración macular “seca” relacionada con la edad). Estos genes fueron colocados bajo el control de uno de cada uno de dos promotores fuertes separados que se sabe que son activos en las células humanas de retina, córnea, y de epitelio de pigmento retinal, y se demostró la inhibición de la neovascularización de la córnea en un modelo de conejo.

Adicionalmente, este sistema de vectorización, cuando alberga genes que se sabe que son deficientes en pacientes humanos con enfermedad de ojos heredada, puede transferir genes a las células oculares humanas. La transferencia de estos genes mediante este sistema constituye la base para terapias útiles para esos pacientes con enfermedades en los ojos.

La presente invención está dirigida a un método de inhibición de la proliferación celular intraocular en un individuo que necesite un tratamiento de ese tipo, tal como un individuo que tenga una enfermedad ocular. El método comprende la etapa de: administrar a dicho individuo una dosis farmacológicamente activa de un vector lentiviral que comprende un gen terapéutico que inhibe la proliferación celular intraocular.

La presente invención está dirigida también a un método de inhibición de neovascularización intraocular en un individuo que tiene una enfermedad ocular, que comprende la etapa de: administrar a dicho individuo una dosis farmacológica efectiva de un vector lentiviral que comprende un gen terapéutico que inhibe la neovascularización intraocular.

Estos y otros aspectos, características y ventajas de la presente invención, resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue de las realizaciones actualmente preferidas de la invención. Estas realizaciones se proporcionan a efectos de divulgación.

Breve descripción de los dibujos

De ese modo, la materia sobre la que las características, ventajas y objetos de la invención citados en lo que antecede, así como otros que resultarán claros a partir de la misma, han sido alcanzados y pueden ser comprendidos a partir de las descripciones más particulares, detalladas, de la invención, se han resumido brevemente en lo que antecede, haciendo referencia a determinadas realizaciones de la misma que se han ilustrado en los dibujos anexos. Estos dibujos forman parte de la descripción. Debe apreciarse, sin embargo, que los dibujos anexos ilustran realizaciones preferidas de la invención y por lo tanto no se considera que limiten su alcance.

La figura 1 representa un vector (proporcionado por Dr. Inder Verma, Instituto Salk, San Diego, CA). VIH: virus de inmunodeficiencia humana; LTR: repetición terminal largo; GAG: gen GAG de VIH; POL: transcriptasa reversa de VIH; ENV: gen envolvente de VIH; rre: elemento de respuesta rev; CNV: citomegalovirus; VSV: virus de estomatitis vesicular; Poli A: señal de poliadenilación; Promotor específico: cualquier promotor de aumento de transcripción puede ser colocado aquí con el fin de modular los aspectos espacial, temporal o cuantitativo de la expresión de gen terapéutico. Gen terapéutico: cualquier gen con potencial terapéutico puede ser colocado aquí – los ejemplos incluyen, aunque sin limitación, un gen de retinoblastoma constitutivamente activo, o genes cuya deficiencia da como resultado una enfermedad.

La figura 2 muestra transducción *in vitro* de las siguientes líneas celulares humanas: células epiteliales de pigmento de retina humana (RPE), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), fibroblastos coroidales (CF), células de retinoblastoma (derivado de retina) humano (Weri-Rb-1 e Y79). Estas líneas celulares fueron transducidas con partículas lentivirales que contenían un gen marcador (el gen de proteína fluorescente verde potenciada) y la fracción de células que expresan el gen marcador cuando se determina mediante clasificación de célula activada fluorescente. Se observa una respuesta a la dosis según son transducidas más células con mayores cantidades de partículas lentivirales (multiplicidad de infección – MOI).

La figura 3A muestra la transducción lentiviral de células epiteliales cultivadas de pigmento retinal. La expresión de gen marcador (eGFP) da como resultado células fluorescentes, verdes. La figura 3B muestra el análisis de eficacia de transducción por clasificación de célula activada fluorescente. Los datos por fuera del pórtico de R2 en el primer panel reflejan la falta de fluorescencia de la transducción. El segundo panel muestra el cambio post-transducción a

una fluorescencia >95%.

La figura 4 ilustra la actividad mitótica y la eficacia de transducción en células epiteliales de pigmento retinal humanas. Las células epiteliales de pigmento retinal humanas fueron transducidas mediante vectores virales lentivirales o de leucemia murina (NLV). Las células fueron mitóticamente inactivas (confluentes) o mitóticamente activas (crecientes) en el momento de la exposición al vector. Estos resultados mostrados en la figura 4 muestran la capacidad superior de los vectores lentivirales sobre otros vectores retrovirales para transducir células no divisoras.

La figura 5 representa estabilidad de expresión en células epiteliales de pigmento retinal humano. Las células fueron expuestas a eGFP que contenía vectores lentivirales y fueron mantenidas posteriormente durante al menos 120 días en cultivo continuo. La figura 5A representa la estabilidad de expresión de eGFP en estas células, así como también una falta de selección respecto a, o frente a, células lentiviralmente transducidas (la fracción de células transducidas se mantiene constante con el tiempo). La figura 5B es el resultado del análisis Southern sobre 5 poblaciones clonales de células. El canal 1 contiene ADN genómico procedente de la línea parental sin transducir. Los canales 2 y 3 contienen ADN procedente de células que fueron expuestas al vector pero no son verdes (sin transducir). Los canales 4 y 5 contienen ADN de células verdes, transducidas. Las células mantienen eGFP positivo como resultado de la integración genómica.

La figura 6 ilustra expresión de transgén de célula fetal humana. Este gráfico representa el modo altamente eficiente de transducción conseguido con vectores lentivirales cuando se comparan con un vector no lentiviral (MND-eGFP) o un vector no viral (control) en células fetales humanas.

La figura 7 muestra transducción de córnea. La figura 7A es una representación esquemática de la córnea humana. La figura 7B muestra transducción endotelial de córnea humana mediante un vector lentiviral que contiene eGFP. Los botones corneales humanos, retirados en el momento del trasplante de córnea, fueron expuestos a partículas lentivirales. La membrana de Descemet fue retirada a continuación y fotografiada con luz ambiental (izquierda) y bajo condiciones sujetas a detección de fluorescencia (derecha). La figura 7C muestra transferencia de gen de eGFP mediada lentiviral a células epiteliales de córnea humana. El sub-panel A es una microfotografía iluminada de una córnea humana con una capa epitelial artificialmente desprendida. La microfotografía fluorescente (sub-panel B) revela fluorescencia epitelial.

La figura 8 proporciona un ejemplo de transferencia de gen lentiviral de un gen cuya deficiencia da como resultado una enfermedad humana. El tejido epitelial de pigmento retinal (RPE) o retinal humano normal, extirpado quirúrgicamente en el momento de la nucleación para retinoblastoma, fue expuesto a vectores lentivirales que, o bien carecían de gen terapéutico (Mock), o bien contenían el gen de periferina humana. Este gen, cuando es genéticamente deficiente en humanos, se sabe que da como resultado una amplia diversidad de fenotipos de desactivación. Se han mostrado los resultados de la reacción reversa de cadena de polimerasa asistida por transcriptasa (rt-PCR) que emplea imprimadores designados para reconocer solamente los genes de periferina transferidos. La expresión de periferina humana en la retina humana y en el epitelio de pigmento retinal, ha sido demostrada claramente.

La figura 9 muestra la expresión lentiviral mediada de mRNA de CA-rb. Ésta muestra los resultados de una reacción reversa de cadena de polimerasa asistida por transcriptasa (rt-PCR) que emplea imprimadores diseñados para reconocer solamente la forma constitutivamente activa del gen de retinoblastoma. Canal 1: marcador; Canal 2: resultados de reacción con ARN aislado a partir de células transducidas de eGFP lentiviral; Canal 3: resultados de reacción con ARN aislado a partir de células transducidas de CA-rb lentiviral. El producto de reacción fue de la dimensión esperada.

La figura 10 muestra el efecto inhibitorio del vector lentiviral de gen de retinoblastoma constitutivamente activo sobre división celular retinal y coroidal humana. Las células fueron expuestas a diluciones decrecientes de una única cepa lentiviral (dilución de 1:400 a dilución de 1:50) y el crecimiento fue comparado con células expuestas a vectores lentivirales que no contenían el gen de retinoblastoma constitutivamente activo. Se observó claramente un efecto inhibitorio sobre la división celular con el paso del tiempo, y este efecto fue dependiente de la dosis.

La figura 11 muestra el efecto inhibitorio de CA-rb sobre la división de las células epiteliales de la lente humana. Las células extraídas de ojos humanos en el momento de la extracción de la catarata fueron expuestas a diluciones decrecientes de una única cepa lentiviral (dilución de 1:400 a dilución de 1:50) y el crecimiento fue comparado con células expuestas a vectores lentivirales que no contenían el gen de retinoblastoma constitutivamente activo. Se observó claramente un efecto inhibitorio sobre la división celular con el tiempo, y este efecto fue dependiente de la dosis.

La figura 12 muestra los efectos inhibitorios *in vivo* del CA-br lentiviral sobre la proliferación celular intraocular de ceguera. Se indujo vitreoreniopatía proliferativa en tres conjuntos de conejos. Un conjunto no fue tratado, un conjunto fue tratado con vectores lentivirales que carecían del gen de retinoblastoma constitutivamente activo, y el último conjunto fue tratado con CA-rb lentiviral suministrado intra-vitrealmente. La vitreoretinopatía proliferativa y el desprendimiento de retina fueron observados en los dos primeros conjuntos con una alta frecuencia (>90%). La

fracción de animales que llegaron al desprendimiento de retina fue significativamente más baja en el conjunto tratado con gen de retinoblastoma constitutivamente activo (26%). En la figura se han mostrado dos fotografías de retina. El ojo de la izquierda tenía una retina completamente desprendida y fue tratado con gen de retinoblastoma constitutivamente activo. El ojo de la derecha tenía una retina completamente desprendida, a consecuencia de la proliferación celular vitreoretinopática intraocular, y fue tratado con vectores lentivirales que carecían del gen CA-rb.

La figura 13 muestra el efecto inhibitorio *in vivo* del CA-rb lentiviral sobre el proceso de opacificación capsular posterior de extracción post-lente. Tres conjuntos de conejos fueron sometidos a facoemulsificación estándar para extraer la lente cristalina natural. El primer conjunto (grupo 1) no fue tratado posteriormente con nada y los dos segundos conjuntos fueron tratados con construcciones lentivirales vacías (sin ningún gen terapéutico, grupo 2) o bien con CA-rb lentiviral (grupo 3) suministrado a la bolsa capsular de lente intacta en el momento de cierre de la herida de catarata. Los animales fueron examinados detenidamente en cuanto a la presencia de opacificación capsular posterior. La presencia de opacificación fue graduada en una escala del 1 al 5, en la que 1 representada nada de opacificación y 5 representada una opacificación severa suficiente para impedir la visualización de la retina con oftalmoscopio binocular indirecto. No se obtuvieron resultados estadísticamente diferentes entre los grupos 1 y 2 (ningún tratamiento y vector vacío). El gráfico de la presente figura muestra un efecto inhibitorio de choque del CA-rb sobre el desarrollo de opacificación de cápsula posterior. En el día 28, los animales de control tenían una graduación de opacificación media de 4,4, mientras que los animales tratados con CA-rb lentiviral tenían una graduación de opacificación media de 2,1.

La figura 14 muestra un mapa para un gen de fusión de endostatina 18/angiostatina suministrado por un vector lentiviral.

La figura 15 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-CMV-Endo/Ang-ires-eGFP portador de un gen de fusión de endostatina/angiostatina.

La figura 16 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-CMV-BIK-ires-eGFP portador de un gen BIK.

La figura 17 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-CMV-Endo/Kringle-ires-EGFP portador de un gen de fusión de endostatina/kringle.

La figura 18 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-CMV-KDR-ires-eGFP portador de un gen KDR.

La figura 19 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-CMV-P16-ires-eGFP portador de un gen p16.

La figura 20 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-CMV-P21-ires-EGFP portador de un gen p21.

La figura 21 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-CMV-Timp1-ires-eGFP portador de un gen Timp1.

La figura 22 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Ang-ires-eGFP portador de un gen de angiostatina.

La figura 23 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Endo XV-ires-eGFP portador de un gen XV de endostatina.

La figura 24 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Endo Ang-ires-eGFP portador de un gen de fusión de endostatina/angiostatina.

La figura 25 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Endo Kringle-ires-eGFP portador de un gen de fusión de endostatina/kringle.

La figura 26 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Kringle 1-5-ires-eGFP portador de un gen Kringle.

La figura 27 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-MigIP10-ires-eGFP portador de un gen de fusión de Mig/IP10.

La figura 28 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Timp1-ires-eGFP portador de un gen Timp1.

La figura 29 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Timp4-ires-eGFP portador de un gen Timp4.

La figura 30 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-P21-ires-eGFP portador de un gen p21.

La figura 31 muestra un mapa para el vector lentiviral pHR-EF1/HTLV-Endo XVIII-ires-eGFP portador de un gen XVIII de endostatina.

La figura 32 muestra la RT-PCR de mRNA aislado a partir de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (hDMVE) transducidas con el gen de fusión de endostatina-18/angiostatina. Canal 1: mezcla escalar de 1000/100; canal 2-5: RT-PCR de mRNA aislado a partir de células hDMVE transducidas con 1 µl, 5 µl, 10 µl y 20 µl de sobrenadante de virus pHR'-eF1α/HTLV-Endo:Ang-IRES-eGFP procedente de un solo pocillo de una placa de 12 pocillos; canal 6: RT-PCR de mRNA aislado a partir de células hDMVE incubadas con 20 µl de PBS; canal 7: control negativo (H₂O como plantilla para la RT-PCR); canal 8: escala de 100 bp.

La figura 33 muestra la presencia de eGFP en la microbolsa corneal en animales tratados. La figura 33A muestra una microfotografía que demuestra la presencia de expresión de eGFP en una microbolsa. La figura 33B muestra una microfotografía no fluorescente del mismo tejido que el mostrado en la figura 33A. La figura 33C muestra una microfotografía fluorescente de un tejido procesado de forma similar procedente de un animal sin tratar.

La figura 34 muestra un efecto inhibitorio sobre la neovascularización en animales tratados con un vector lentiviral de Mig/IP10. La figura 34A muestra una fotografía de una córnea normal (no tratada, no estimulada). La figura 34B muestra una fotografía de una córnea demandada alcalina de un animal tratado con un vector lentiviral de Mig/IP10. Obsérvese la falta de vasos sanguíneos en la córnea. La figura 34C muestra una fotografía de una córnea demandada alcalina de un animal tratado con un vector lentiviral de control sin ningún gen anti-angiogénico terapéutico. Obsérvese la invasión de vasos sanguíneos en la córnea. La figura 34D muestra una fotografía de una córnea demandada alcalina de un animal sin tratar. Obsérvese la invasión de vasos sanguíneos en la córnea.

Descripción detallada de la invención

Los lentivirus son virus lentos cuya patogenicidad natural ocurre durante un período de meses a años. Estos genes virales incluyen retrovirus tales como el VIH. Se sabe que estos virus infectan y transducen una amplia diversidad de tipos de células humanas mitóticamente activas o inactivas, terminalmente diferenciadas. Su eficacia de transducción es muy alta, incluso las líneas de células tradicionalmente muy refractarias a la transferencia de gen tales como las células humanas retinales, corneales, trabeculares, lenticulares, epiteliales de pigmento retinal, vitreoretinopáticas proliferativas y endoteliales vasculares, pueden ser transducidas con la utilización de este vector.

Tras la infección con el lentivirus, el material genético viral se integra en sí mismo en el interior del genoma anfitrión. Así, los genes virales se transforman en una parte permanente del material genético de la célula anfitrión y la expresión de gen es constante durante la vida de la célula. Cada célula transducida por un lentivirus transmitirá la información genética a su progenie. El uso de lentivirus como vectores en terapia de gen para enfermedades intraoculares, es posible debido a que, bajo condiciones naturales de infección con el virus parental, el virus es un patógeno intraocular que no está asociado con ninguna respuesta inflamatoria. El trabajo previo con este virus ha demostrado su uso con éxito en la transducción tanto de células neuronales como retinales (Naldini et al., 1996; Miyoshi et al., 1997).

La presente invención proporciona un nuevo vector lentiviral que incorpora un elemento de IRES (sitio de entrada de ribosoma interno) entre dos sitios de clonación. El elemento de IRES permite la formación de enlace de mRNA-ribosoma y la síntesis de proteína. Este esqueleto puede albergar dos genes expresables diferentes. Se produce un único mensaje en las células transducidas; sin embargo, debido al elemento de IRES, este mensaje es funcionalmente bi-cistrónico y puede activar la síntesis bajo el control de fuertes promotores tales como los promotores de CMV o de HTLV. Alternativamente, un experto en la materia podría emplear fácilmente otros promotores conocidos como activos en las células humanas retinales, corneales o epiteliales de pigmento retinal. De esta forma, cada uno de los genes potencialmente terapéuticos discutidos en lo que sigue, puede ser enlazado a un gen marcador (por ejemplo, el gen fluorescente verde incrementado – gen eGFP) de modo que las células transducidas podrán ser marcadas simultáneamente y estarán capacitadas para expresar el gen terapéutico de interés. Las células marcadas pueden ser fácilmente aisladas *in vitro* y ser observadas *in vivo*. Resultará evidente para un experto en la materia que otros genes marcadores, además del gen de proteína fluorescente verde incrementado, podrían ser incorporados en el vector lentiviral. Puesto que el nivel de experiencia normal de un científico medio en las áreas de ingeniería genética y clonación se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, una persona que tenga una experiencia normal en esta materia podría fácilmente estar capacitada para construir vectores lentivirales que contengan otros genes terapéuticos de interés además de los que se han divulgado en la presente memoria. Además, el sistema de vector lentiviral divulgado en la presente memoria puede transferir genes conocidos que sean deficientes en pacientes humanos con enfermedad ocular heredada o con otras enfermedades. La transferencia de estos genes a células oculares humanas o a otros tejidos mediante este sistema constituye la base para terapias usuales para pacientes con diversas enfermedades.

El descubrimiento básico detallado en la presente memoria demuestra que los vectores lentivirales pueden transferir una diversidad de genes para modificar la proliferación intraocular anormal y, con ello, reducir la incidencia de la enfermedad neovascular, el desprendimiento de retina o la opacificación capsular posterior de extracción post-catarata. Un número de genes terapéuticos pueden ser útiles en circunstancias clínicas para inhibición *in vivo* de división celular intraocular. Estos genes incluyen una diversidad de moduladores recientemente identificados para el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) o apoptosis. Se estima que el control genético de la expresión de estos moduladores mediante transferencia de gen mediada por lentivirus, podría demostrar ser

útil en el tratamiento de enfermedades neovasculares intraoculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la retinopatía de prematuridad (RO) y la retinopatía diabética proliferativa (PDR).

Los vectores lentivirales divulgados en la presente memoria pueden ser aplicados fácilmente en entornos clínicos.

5 Las células endoteliales vasculares juegan un papel principal tanto en la vasculogénesis como en la angiogénesis. Estas células responden mitogénicamente (se vuelven activas con relación a la división o migración celular) a una diversidad de citoquinas de proteína. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiogenina, la angiopoyetina-1 (Ang1) y la angiotropina son citoquinas que estimulan la división endotelial de la
10 célula, la migración o la adhesión célula-célula, y de ese modo favorecen el proceso de angiogénesis. La endostatina, los receptores solubles (señuelos) de VEGF (sf1t), y la trombospondina son citoquinas de proteína endógena que parecen mostrar angiogénesis. La presente invención demuestra que muchas de estas proteínas inhibitoras suministradas mediante vectores lentivirales son útiles en el tratamiento de neovascularización intraocular. Ejemplos de genes que pueden ser incorporados en los vectores lentivirales de la presente invención
15 incluyen, aunque sin limitación, los siguientes genes:

INHIBIDORES DE TEJIDO DE METALOPROTEINASAS

20 Los inhibidores de tejido de metaloproteinasas (TIMPs) representan una familia de proteínas ubicuas que son inhibidores naturales de las metaloproteinasas matrices (MMPs). Las metaloproteinasas matrices son un grupo de endopeptidasas de enlace de zinc involucradas en la remodelación y la degeneración de la matriz de tejido conectivo de la matriz extracelular (ECM), una etapa esencial en la invasión, angiogénesis y metástasis tumoral. Las MMPs tienen, cada una de ellas, especificidades de sustrato diferentes dentro de la ECM y son importantes en su degradación. El análisis de las MMPs en la patología mamaria humana mostró que varias MMPs estaban
25 involucradas en la degradación de la ECM: la colagenasa (MMP1) degrada los colágenos intersticiales fibrilares; la gelatinasa (MMP2) degrada principalmente el colágeno de tipo IV; y la estromelisin (MMP3) posee una gama de acción más amplia (Bramhall et al., 1996, 1997). Éstos son cuatro miembros de la familia TIMP. La TIMP-1 y la TIMP-2 están capacitadas para inhibir el crecimiento, la invasión y la metástasis tumoral que han sido relacionados con la actividad inhibitoria de la MMP. Además, tanto la TIMP-1 como la TIMP-2 están involucradas en la inhibición
30 de la angiogénesis. A diferencia con otros miembros de la familia TIMP, la TIMP-3 ha sido encontrada solamente en la ECM y puede funcionar como un marcador para diferenciación terminal. Finalmente, se cree que la TIMP-4 funciona de una manera específica del tejido en la hemostasis de matriz extracelular (Gómez et al., 1997).

TIMP-1

35 El inhibidor de metaloproteinasa-1 del tejido (TIMP-1) es una proteína de 23 kD que es también conocida como inhibidor 1 de metaloproteinasa, inhibidor de colagenasa de fibroblasto, inhibidor de colagenasa y actividad de potenciación de eritroide (EPA). El TIMP-1 de codificación de gen ha sido descrito por Docherty et al. (1985). Los complejos de TIMP-1 con metaloproteinasas (tales como colagenasas) provocan una inactivación irreversible. Los
40 efectos del TIMP-1 han sido investigados en modelos de ratones transgénicos: uno que sobre-expresó el TIMP-1 en el hígado, y otro que expresó el antígeno (TAg) de oncógeno viral Virus de Simio 40/T que conduce al desarrollo hereditario de carcinomas hepatocelulares. En experimentos transgénicos dobles (las líneas de TIMP-1 fueron cruzadas con la línea transgénica TAg), se informó que la sobre-expresión de TIMP-1 hepático bloquea el desarrollo de carcinomas hepatocelulares inducidos por TAg mediante la inhibición del crecimiento y angiogénesis (Martin et al., 1996).
45

TIMP-2

50 El inhibidor de metaloproteinasa-2 del tejido (TIMP-2) es una proteína de 24 kD que es también conocida como inhibidor 2 de metaloproteinasa. El gen que codifica el TIMP-2 ha sido descrito por Stetler-Stevenson et al. (1990). La metaloproteinasa (MMP2) que juega un papel crítico en la invasión tumoral, es complejada e inhibida por el TIMP-2. De ese modo, el TIMP-2 podría ser útil para inhibir la metástasis cancerígena (Musso et al., 1997). Cuando las células de melanoma de murina B16F10 (una línea celular altamente invasiva metastática) fueron transfectadas con un plásmido que codifica el TIMP-2 humano y se inyectaron subcutáneamente en ratones, la sobre-expresión
55 del TIMP-2 limitó el crecimiento tumoral y la angiogénesis *in vivo* (Valente et al., 1998).

TIMP-3

60 El inhibidor de metaloproteinasa-3 del tejido (TIMP-3) es también conocido como inhibidor 3 de metaloproteinasa. Cuando las líneas de células de carcinoma de mama y de melanoma maligno fueron transfectadas con plásmidos de TIMP-3 y se inyectaron subcutáneamente en ratones *desnudos*, se observó la supresión del crecimiento del tumor (Anand-Apte et al., 1996). Sin embargo, la sobre-expresión del TIMP-3 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de las dos líneas celulares tumorales *in vitro*. De ese modo, se ha sugerido el TIMP-3 liberado hasta la ECM adyacente por parte de las células tumorales, inhibió el crecimiento del tumor por supresión de la liberación de factores de crecimiento secuestrados en la ECM, o por inhibición de la angiogénesis (Anand-Apte et al., 1996).
65

TIMP-4

El inhibidor de metaloproteinasa-4 del tejido (TIMP-4) es también conocido como inhibidor 4 de metaloproteinasa. El gen de TIMP-4 y la localización del tejido, han sido descritos por Greene et al. (1996). Los estudios bioquímicos han mostrado que el TIMP-4 enlaza con la gelatinasa A humana similar a la del TIMP-2 (Bigg et al., 1997). El efecto de la modulación de TIMP-4 sobre el crecimiento de los cánceres de mama humanos *in vivo*, fue investigado por Wang et al. (1997). Se encontró que la sobre-expresión de TIMP-4 inhibía la invasividad de la célula *in vitro*, y el crecimiento tumoral se redujo significativamente a continuación de la inyección de ratones desnudos con transfectantes de células tumorales de TIMP-4 *in vivo* (Wang et al., 1997).

ENDOSTATINA, ANGIOSTATINA, PEX, KRINGLE-5 Y GENES DE FUSIÓN

J. Folkman y sus colegas (Boehm et al., 1997), demostraron que el tratamiento de ratones con carcinoma de pulmón de Lewis con la combinación de las proteínas endostatina + angiostatina, indujo la regresión completa de los tumores, y que los ratones se mantuvieron sanos durante el resto de su vida. Este efecto fue obtenido solamente después de un ciclo (25 días) de tratamiento con endostatina + angiostatina, mientras que la endostatina sola necesitó 6 ciclos para inducir el letargo del tumor.

D. Hanahan y sus colegas (Bergers et al., 1999) demostraron el efecto antitumoral superior de la combinación de las proteínas endostatina + angiostatina en un modelo de ratón respecto al carcinoma de islote pancreático. La combinación de endostatina + angiostatina dio como resultado una regresión significativa de los tumores, mientras que la endostatina o la angiostatina solas no tuvieron ningún efecto.

Endostatina XVIII

La endostatina, un inhibidor de la angiogénesis producido por el hemangioendotelioma, fue identificada en primer lugar por O'Reilly et al. (1997). La endostatina es un fragmento terminal C de 20 kD de colágeno XVIII que inhibe específicamente la proliferación endotelial, y que inhibe potencialmente la angiogénesis y el crecimiento tumoral. De hecho, los tumores primarios han demostrado retroceder a lesiones microscópicas latentes a continuación de la administración de endostatina recombinante (O'Reilly et al., 1997). Se ha informado que la endostatina inhibe la angiogénesis por enlace con los proteoglicanos de sulfato de heparina involucrados en la señalización del factor de crecimiento (Zetter, 1998).

Endostatina XV

Recientemente, se ha demostrado que un fragmento de terminal C de colágeno XV (endostatina XV) inhibe la angiogénesis como la Endostatina XVIII, pero con severas diferencias funcionales. (Sasaki et al., 2000).

Angiostatina

La angiostatina, un fragmento interno de plasminógeno que comprende las primeras cuatro estructuras kringle, es uno de los más potentes inhibidores de angiogénesis endógena que se han descrito hasta la fecha. Se ha demostrado que la administración sistémica de angiostatina suprime eficazmente el crecimiento de glioma maligno *in vivo* (Kirsch et al., 1998). La angiostatina ha sido también combinada con radioterapia convencional, dando como resultado una erradicación tumoral incrementada sin incremento de los efectos tóxicos *in vivo* (Mauceri et al., 1998). Otros estudios han demostrado que la transferencia de gen mediado retroviral o adenoviral de cADN de angiostatina, dio como resultado la inhibición del crecimiento de células tumorales *in vitro* y de la angiogénesis *in vivo*. La inhibición de la angiogénesis inducida por tumor produjo un incremento de muerte de células tumorales (Tanaka et al., 1998). Se ha demostrado que la transferencia de gen de un cADN que codifica la angiostatina de ratón en células de fibrosarcoma de murina T241, suprime el crecimiento de tumores primarios y metastáticos *in vivo* (Cao et al., 1998).

PEX

El PEX es un dominio de hemopexina de terminal C del MMP-2 que inhibe el enlace de MMP-2 con la actividad colagenolítica de la superficie celular de bloqueo de la alfavbeta3 de integrina requerida para la angiogénesis y el crecimiento tumoral, que fue clonado y descrito por Brooks et al. (1998).

Kringle-5

El dominio kringle-5 de plasminógeno humano, que comparte una alta homología secuencial con los cuatro kringles de la angiostatina, ha demostrado ser un inhibidor específico frente a la proliferación de células endoteliales. El kringle-5 parece ser más potente que la angiostatina en cuanto a la inhibición de proliferación de células endoteliales capilares estimuladas por factor de crecimiento de fibroblasto básico (Cao et al., 1997). Adicionalmente a sus propiedades anti-proliferativas, el kringle-5 presenta también una actividad anti-migratoria similar a la de la angiostatina, que afecta selectivamente a las células endoteliales (Ji et al., 1998).

Genes de fusión angiostática

5 Los novedosos genes de fusión angiostática pueden ser clonados utilizando un motivo de péptido de elastina (Val-Pro-Gly-Val-Gly) como ligante. Estas fusiones combinan dos potentes genes angiostáticos para incrementar la supresión de angiogénesis tumoral. Dado que estas moléculas operan a través de diferentes mecanismos, su combinación puede dar como resultado efectos sinérgicos. Ejemplos de proteínas de fusión angiostática incluyen, aunque sin limitación, la fusión de endostatina 18 y angiostatina (endo/ang), endostatina 18 y el motivo de plasminógeno de kringle 5 (endo/k5), así como la monoquina inducida por interferón-gamma y la proteína 10
10 inducible por interferón-alfa (MIG/IP10).

QUIMIOCINAS

15 Las quimiocinas son citoquinas pro-inflamatorias de bajo peso molecular capacitadas para producir quimiotaxis de leucocito. Dependiendo de la quimiocina considerada, la quimioatracción es específica para ciertos tipos de célula de leucocitos. Los genes de quimiocina expresables en tumores pueden conducir a un reclutamiento más eficiente de leucocitos capacitados para la actividad anti-tumoral. Además, adicionalmente a su actividad quimiotáctica, tales quimiocinas poseen una actividad anti-angiogénica: éstas inhiben la formación de vasos sanguíneos que alimenten al tumor. Por esta razón, estas quimiocinas son útiles en el tratamiento del cáncer.

20
MIG

La Mig, la monoquina inducida por interferón-gamma, es una quimiocina CXC relacionada con la IP-10 y producida por monocitos. La Mig es un quimioatrayente para las células T activadas, y también posee fuertes propiedades angiostáticas. Las inyecciones intratumorales de Mig indujeron necrosis tumoral (Sgadari et al., 1997).

IP-10

30 La IP-10, la proteína 10 inducible por interferón-alfa, es un miembro de la familia de la quimiocina CXC. La IP-10 es producida principalmente por monocitos, pero también por células T, fibroblastos y células endoteliales. La IP-10 ejerce una actividad quimiotáctica con las células linfoidales tales como las células T, los monocitos y las células NK. La IP-10 es también un potente inhibidor de la angiogénesis: ésta inhibe la neovascularización por supresión de diferenciación de células endoteliales. Debido a su actividad quimiotáctica hacia las células inmunes, la IP-10 ha sido considerada como un buen candidato para aumentar las respuestas inmunes anti-tumor. La transferencia de gen de la IP-10 en células tumorales, redujo su tumorigenicidad y produjo una respuesta inmune protectora a largo plazo (Luster y Leder, 1993). Se demostró también que la actividad angiostática de la IP-10 medió en la regresión del tumor; las células tumorales que expresan IP-10 se volvieron necróticas *in vivo* (Sgadari et al., 1996). Se demostró también que la IP-10 medió en los efectos angiostáticos de la IL-12 que condujeron a la regresión del tumor (Tannebaum et al., 1998).

40
RECEPTORES VEGF SOLUBLES

El FLT-1 (receptor de quinasa 1 de tirosina a modo de fms) es un receptor de VEGF enlazado por membrana (Receptor 1 de VEGF). Se ha demostrado que un fragmento soluble de FLT-1 (sFLT-1) tiene propiedades angiostáticas en virtud de su actividad antagonista frente a VEGF. El FLT-1 soluble actúa mediante enlace con el VEGF, pero debido también a que enlaza con, y bloquea, el dominio externo del FLT-1 enlazado por membrana (Kendall y Thomas 1993, Goldman et al., 1998). Un ejemplo de sFLT-1 es un sFLT-1 humano que abarca los 7 dominios en forma de inmunoglobulina de la parte externa de FLT-1.

50 sFLK-1 / KDR

El FLK-1 o KDR (receptor de dominio de inserción de quinasa) es un receptor enlazado por membrana de VEGF (Receptor 2 de VEGF). Se ha demostrado que un fragmento soluble de KDR (sKDR) tiene propiedades angiostáticas en virtud de su actividad antagonista frente a VEGF, debido probablemente a que enlaza con el VEGF pero debido también a que enlaza con, y bloquea, el dominio externo del KDR enlazado por membrana (Kendall y Thomas, 1996, Millauer et al., 1994). Un ejemplo de sKDR es un sKDR humano que abarca los 7 dominios en forma de inmunoglobulina de la parte externa del KDR.

60
APOPTOSIS

La apoptosis es un término utilizado para describir el proceso de muerte celular o de suicidio celular programado. Este proceso es un componente normal del desarrollo y salud de los organismos multicelulares. La regulación anormal de la apoptosis ha sido implicada en una diversidad de desórdenes patológicos desde el cáncer hasta las enfermedades auto-inmunes.

BIK

La Bik es una potente proteína pro-apoptótica de 18 kD (160 aminoácidos), conocida también como eliminador de interacción Bcl-2, inductor de apoptosis NBK, BP4 y BIP1. La Bik está codificada por el gen bik (o nbk). La función de la Bik consiste en acelerar la muerte celular programada por complejamiento con varios represores de apoptosis tales como Bc1-XL, BHRF1, Bcl-2, o su proteína E1B homóloga de adenovirus. En estudios de transfección transitoria, la Bik fomentó la muerte celular de una manera similar a los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak (Boyd et al., 1995).

10 BAK

La Bak, una homóloga de la Bcl-2, es una proteína pro-apoptótica que fomenta la apoptosis por enlace con miembros de una familia anti-apoptótica incluyendo la Bcl-2 y la Bc1-XL, que inhibe su actividad según se ha descrito anteriormente para la Bik (Chittenden et al., 1995).

15 BAX

La Bax es una proteína de 21 kD que funciona como un regulador de apoptosis. La Bax acelera la muerte celular programada por dimerización con, y antagonización del represor Bcl-2 de apoptosis. La relación de estos dímeros de proteína se piensa que está relacionada con la iniciación de la apoptosis. El efecto de la expresión de Bax recombinante en las células de eritroleucemia K562 ha sido investigado por Kobayashi et al. (1998). La transfección con vector de Bax en células K562 dio como resultado la inducción de apoptosis. Además, se encontró que las células transfectadas establemente con Bax eran más sensibles a los agentes quimioterapéuticos ara-X, dosorubicina, y SN-38 (Kobayashi et al., 1998).

25 BAD

La proteína Bad (componente 6 de enlace de Bc1-2, gen bad o bbc6 o bc128) es una pequeña proteína (168 aminoácidos, 18 kDa) que fomenta la muerte celular. Ésta compite con éxito para su enlace a la Bc1-XL y la Bcl-2, afectando con ello al nivel de heterodimerización de estas proteínas con Bax. Ésta puede invertir la actividad represora de muerte de la Bc1-XL, pero no de la Bcl-2.

BCL-2

35 La leucemia/linfoma-2 de célula B (Bcl-2) es el miembro prototipo de una familia de proteínas reguladoras de muerte celular. La Bcl-2 se ha encontrado principalmente en la mitocondria y bloquea la apoptosis por interferencia con la activación de las caspasas. Se ha demostrado que la transferencia de gen de la Bcl-2 en células tumorales incrementa su potencial metastático (Miyake et al., 1999). La transferencia de gen de la Bcl-2 puede ser aplicada al trasplante de médula ósea puesto que la Bcl-2 aumenta la supervivencia de las células del tronco hematopoyético tras la reconstitución del receptor irradiado (Innes et al., 1999). También, la transferencia de gen de Bcl-2 podría ser útil contra las enfermedades neurodegenerativas puesto que la expresión de la Bcl-2 en neuronas las protege frente a la apoptosis (Saille et al., 1999).

45 BCL-XS

El Bcl-XS (isoforma corta) es un represor negativo dominante de la Bcl-2 y la Bcl-XL. Éste ha sido utilizado en experimentos de terapia de gen para iniciar la apoptosis en tumores que expresan Bcl-2 y Bcl-XL. La expresión de Bcl-XS reduce el tamaño del tumor (Ealovega et al., 1996) y sensibiliza las células del tumor respecto a los agentes quimioterapéuticos (Sumatran et al., 1995), sugiriendo un papel para la Bcl-XS en la iniciación de la muerte celular en tumores que expresan Bcl-2 o Bcl-XL (Dole et al., 1996).

GAX

55 El Gax es un gen homeótico que codifica un factor de transcripción que inhibe la proliferación celular de una manera dependiente de la p21. El Gax está sub-regulado cuando las células se estimulan para que proliferen. La sobre-expresión de Gax conduce a la sub-regulación de la Bcl-2 y a la súper-regulación de Bax en células activadas por mitogén (Perlman et al., 1998). De ese modo, el Gax puede ser útil para inhibir el crecimiento de ciertas células tumorales. Además, la sobre-expresión de Gax en las células del músculo vascular blando inhibe su proliferación (Perlman et al., 1999). Por ello, la transferencia de gen Gax podría limitar la estenosis vascular que sigue a los accidentes vasculares.

GENES SUPRESORES DE TUMORES

65 Diversas mutaciones de genes supresores de tumores han sido asociadas a diferentes tipos de cánceres. En esos casos, la terapia de gen somático con tipos no cultivados de genes supresores de tumores, ha sido contemplada

como alternativa terapéutica anti-cáncer. Las p16, p21, p27 y p53 inhiben el ciclo celular al actuar sobre las quinasas dependientes de la ciclina.

P16

5 La P16, una proteína de 15 kD (148 aminoácidos), se conoce también como CDK4I, P16-INK4, P16-INK4A, o supresor 1 de tumor múltiple (MTS1). La P16 está codificada por el gen *cdkn2a* o el *cdkn2*. La P16 forma un heterodímero con la quinasa 4 y 6 dependiente de la ciclina, impidiendo con ello su interacción con la ciclina D tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, la P16 actúa como un regulador negativo de la proliferación de células normales. Las mutaciones de la P16 (*cdkn2*) están involucradas en la formación de tumores en una amplia gama de tejidos. El *cdkn2a* es borrado homocigóticamente, mutado o desactivado de otro modo en una gran proporción de líneas de células tumorales y en algunos tumores primarios incluyendo los melanomas y tumores del tracto biliar, páncreas y estómago (Biden et al., 1997; Castellano et al., 1997). La pérdida de expresión de gen del p16INK4a se observa habitualmente en los tumores de mesotelioma y en otras líneas celulares. Se ha demostrado que la transducción de p16INK4A con un adenovirus expresante en células de mesotelioma da como resultando un descenso del crecimiento celular, y la muerte de las células transducidas (Frizelle et al., 1998). Además, la transferencia de gen mediada adenoviral de p16 de tipo no cultivado en tres líneas de células de glioma humano (U251 MG, U-87 MG y D54 MG) que no expresaron un gen de p16/CDKN2 endógeno, dio como resultado la detención del crecimiento celular en las fases G0 y G1 (Fueyo et al., 1996). Adicionalmente, la transferencia de gen mediada adenoviral del p16INK4A de tipo no cultivado en líneas celulares de cáncer de pulmón que no expresaron p16-INK4A, inhibió la proliferación tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Jin et al., 1995). De ese modo, la restauración de la proteína P16 de tipo no cultivado en las células tumorales pudo tener utilidad terapéutica contra el cáncer.

p21

25 La p21 es una proteína de 18 kD (164 aminoácidos) conocida también como Inhibidor 1 de Quinasa Dependiente de la Ciclina (CDKN1), proteína 6 asociada de diferenciación de melanoma (MDA-6), y proteína 1 de interacción de CDK. La p21 está codificada por el gen CDKN1 (Harper et al., 1993), conocido también como CIP1 y WAF1. La p21 puede ser el intermediario importante mediante el que la p53 media su papel como inhibidor de proliferación celular en respuesta a daños en el ADN. La p21 puede enlazar con, e inhibir, la actividad de quinasa dependiente de la ciclina, impidiendo la fosforilación de sustratos críticos de quinasa dependiente de la ciclina y el bloqueo de la progresión y proliferación del ciclo celular. La p21 está expresada en todos los tejidos humanos adultos. La transferencia de gen de p21 en células tumorales podría ser útil para inhibir el crecimiento tumoral. La transferencia de gen de la p21 mediada por adenovirus recombinante en dos líneas de células de cáncer de pulmón humano de célula no-pequeña (NSCLC) da como resultado una inducción de p21 dependiente de la dosis y una inhibición del crecimiento celular concomitante debido a la detención del ciclo celular de G0/G1. Además, la inyección de adenovirus portador de p21 en tumores pre-establecidos de NSCLC en ratones redujo el crecimiento del tumor e incrementó la supervivencia de los animales (Joshi et al., 1998). Estos resultados soportan el uso de p21 para terapia de gen del cáncer.

40 De acuerdo con la presente invención, se puede emplear biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la práctica habitual. Tales técnicas han sido completamente explicadas en la literatura. Véase, por ejemplo, Maniatis, Fritsch y Sambrook, "Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio" (1982); "Clonación de ADN; Una Alternativa Práctica", Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); "Síntesis de Oligonucleótidos" (M.J. Gait, ed. 1984); "Hibridación de Ácido Nucleico" (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)); "Transcripción y Traducción" (B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1984)); "Cultivo de Células Animales" (R.I. Freshney, ed. (1986)); "Células y Enzimas Inmovilizadas" (IRL Press, (1986)); B. Perbal, "Una Guía Práctica para Clonación Molecular" (1984).

50 Un "vector" es un replicón tal como un plásmido, un fago o un cósmido, al que se puede anexar otro segmento de ADN con el fin de llevar a cabo la replicación del segmento anexado.

Una "secuencia de promotor" es una región reguladora de ADN capaz de enlazar con la polimerasa de ARN de una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación corriente abajo (dirección 3'). A efectos de definición de la presente invención, la secuencia de promotor está enlazada por su terminación 3' mediante el sitio de iniciación de transcripción y se extiende corriente arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del esqueleto. Dentro de la secuencia de promotor se podrá encontrar un sitio de iniciación de transcripción (definido ventajosamente mediante mapeo con nucleasa S1), así como dominios de enlace de proteína (secuencias de consenso) responsables del enlace de la polimerasa de ARN. Los promotores eucarióticos contendrán con frecuencia, aunque no siempre, bloques "TATA" y bloques "CAT". Se pueden utilizar diversos promotores para activar vectores.

65 Una célula ha sido "transducida" por ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN ha sido introducido en el interior de la célula, normalmente mediante un vector viral. El ADN de transducción puede estar integrado (como en el caso de los vectores lentivirales), o puede no estar integrado (enlazado covalentemente) en el genoma de la célula. En células procariontas, de levadura y de mamíferos por ejemplo, el ADN puede ser mantenido en un elemento episomal

tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula transformada establemente es una en la que el ADN de transformación ha resultado integrado en un cromosoma de modo que sea heredado por las células hijas a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra mediante la capacidad de la célula eucariótica para establecer líneas celulares o clones que comprendan una población de células hijas para establecer

5 líneas de células o clones que comprendan la población de células hijas que contienen el ADN de transformación. Un "clon" es una población de células derivadas de una célula simple o ascendiente común por mitosis. Una "línea de células" es un clon de una célula primaria que está capacitada para un crecimiento estable *in vitro* para formar muchas generaciones.

10 Un "gen terapéutico" se refiere a un gen que confiere un genotipo deseado. Por ejemplo, un gen de retinoblastoma constitutivamente activo (CA-rb) se utiliza para impedir la proliferación intraocular o para restablecer un déficit genético mediante la transferencia de gen de periferina.

15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "gen marcador" se refiere a una secuencia de codificación unida a elementos promotores o potenciadores heterólogos, y cuyo producto puede ser ensayado de forma fácil y cuantificable cuando la composición se introduce en tejidos o células. Los marcadores empleados habitualmente incluyen elementos radiactivos, enzimas, proteínas (tal como la proteína de fluorescencia verde potenciada) o sustancias químicas que fluorescen cuando se exponen a la luz ultravioleta, y otras.

20 La presente invención está dirigida a nuevos medios de tratamiento de enfermedades de ceguera heredada o proliferativa por medio de transferencia de gen lentiviral. Así, la presente invención incluye un vector de lentivirus que porta una secuencia de ADN que codifica un gen útil en el tratamiento de tal enfermedad. Ejemplos de este gen incluyen, aunque sin limitación, el gen de periferina, una forma constitutivamente activa del gen rb y diversos genes terapéuticos discutidos en lo que antecede.

25 La presente invención está dirigida a un método de inhibición de proliferación celular intraocular en un individuo que tiene una enfermedad ocular, que comprende la etapa de administrar a dicho individuo una dosis farmacológicamente activa de un vector lentiviral que comprende un gen terapéutico que inhibe la proliferación celular intraocular. Ejemplos representativos de enfermedades oculares que pueden ser tratadas utilizando este

30 método incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética proliferativa, la retinopatía de prematuridad, el glaucoma, y la vitreoretinopatía proliferativa. El gen terapéutico puede ser una forma constitutivamente activa del gen de retinoblastoma, un gen p16 o un gen p21. Con preferencia, el vector lentiviral se administra en una dosis de alrededor de 10^6 a 10^9 unidades de transducción en el espacio capsular, vítreo o sub-retinal.

35 La presente invención va dirigida también a un método de inhibición de la neovascularización intraocular en un individuo que tiene una enfermedad ocular, comprendiendo la etapa de administrar a dicho individuo una dosis farmacológicamente efectiva de un vector lentiviral que comprende un gen terapéutico que inhibe la neovascularización lentiviral. Ejemplos representativos de enfermedades oculares que pueden ser tratadas

40 utilizando este método de la presente invención incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética proliferativa, la retinopatía de prematuridad, el glaucoma, y la vitreoretinopatía proliferativa. El gen terapéutico puede ser un gen que regule la angiogénesis o la apoptosis. En general, los genes que regulan la angiogénesis incluyen genes que codifican tejido inhibidor de metaloproteínasa (TIMP)-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, endostatina, angiostatina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de hemopexina de terminal C de la

45 metaloproteínasa-2 matriz, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, una proteína de fusión de endostatina y de angiostatina, una proteína de fusión de endostatina y del dominio de kringle 5 de plasminógeno humano, la monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), la proteína 10 inducible por interferón alfa (IP10), una proteína de fusión de Mig y de IP10, FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 similar a fms), y el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR), mientras que los genes que regulan la apoptosis incluyen genes que codifican la isoforma corta de Vcl-2, Bad, Bak, Bax, Bik, Bcl-X, y el Gax. Con preferencia, el vector lentiviral se administra en una

50 dosificación que va desde alrededor de 10^6 a 10^9 unidades de transducción en el espacio capsular, vítreo o sub-retinal.

55 Los ejemplos que siguen se proporcionan con el propósito de ilustrar diversas realizaciones de la invención y no se pretende que limiten la presente invención en modo alguno.

Ejemplo 1

Células y tejido

60 Se establecieron explantes primarios de fibroblastos coroidales humanos (HCF), células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y células epiteliales de pigmento retinal fetal humo (HRPE), y fueron cultivados en condiciones en las que, o bien fomentaban o bien no fomentaban actividad mitótica. Se cultivaron también células estables derivadas de fotorreductor (Y-79 y Weri-Rb-1).

65 La retina y el RPE humanos, obtenidos en el momento de la enucleación para el retinoblastoma, fueron utilizados

para demostrar la capacidad de los vectores lentivirales para transducir estas células mitóticamente inactivas e inducir la expresión de un transgén de periferina humano exógeno. Las córneas humanas obtenidas en el momento de la cirugía de trasplante de córnea fueron utilizadas para demostrar la capacidad de los vectores lentivirales para transducir estas células mitóticamente inactivas con el gen de proteína de fluorescencia verde potenciado por el gen marcador.

Ejemplo 2

Vector de lentivirus

Se utilizó un sistema de vectorización lentiviral basado en tres plásmidos, seudotipado con la envoltente de virus de estomatitis vesicular (VSV) y que contenía el gen de proteína fluorescente verde (GFP) como marcador (figura 1). Los lentivirus recombinantes fueron producidos según ha sido descrito por Naldini et al. El promotor de gen inicial-inmediato de citomegalovirus (CMV) dirigió la expresión de eGFP en el pHR⁺-CMV-eGFP del plásmido. Las cepas de virus fueron generadas como sigue. Células 293T de riñón humano (5×10^6) fueron cultivadas en placas de 10 cm, y fueron co-transfectadas el día siguiente con 10 μ g de pCMV Δ R8.91 (plásmido con función de empaquetamiento), y 2 μ g de pMD.G (la envoltente de VSV-G que contiene plásmido) mediante precipitación de fosfato de calcio en un medio de crecimiento D10 (DMEM alto en glucosa con un 10% de suero bovino fetal) y antibióticos. Después de 12-16 horas a 37 °C, el medio fue extraído y se añadió un medio de crecimiento D10 fresco. Las células fueron cultivadas durante 10 horas adicionales. El medio D10 fresco, que contenía 10 mM de butirato de sodio y 20 mM de solución tampón de Hepes, fue añadido a las células, y las células fueron cultivadas durante otras 12 h. El medio fue sustituido por un nuevo medio D10 que contenía 20 mM de solución tampón de Hepes, y después de 12 horas se recogió el medio que contenía el virus. Se añadió el medio fresco y el sobrenadante fue recogido cada 24 horas durante los 4 días siguientes. El sobrenadante viral fue almacenado a -80 °C inmediatamente después de la recogida.

Las cepas virales fueron concentradas por ultracentrifugación del sobrenadante (19.000 rpm, rotor Beckman SW28) durante 140 minutos a temperatura ambiente y las bolitas virales resultantes fueron re-suspendidas en 1-3 ml de solución salina tamponada con fosfato. Cepas virales alícuotas fueron tituladas con células 293 y las muestras restantes fueron almacenadas a -80 °C.

Todos los sobrenadantes de vector lentiviral fueron comprobados en cuanto a la presencia de retrovirus competente para replicación (PCR) por infección de células mononucleares de sangre periférica humana estimulada con fitohemaglutinina, con el subsiguiente análisis del medio de cultivo respecto a p24 gag mediante ELISA. El RCR no fue detectado en ninguno de los sobrenadantes virales producidos.

Ejemplo 3

Transducción de vector de lentivirus

Se generaron sobrenadantes que contenían 2×10^6 partículas/ml lentivirales deficientes de replicación mediante la transfección de células 293T con el vector de lentivirus descrito en lo que antecede. Las células fueron cultivadas con las partículas virales durante 24 horas y recuperadas a continuación en medios normales durante cuatro días con anterioridad a la determinación de expresión de GFP mediante clasificación celular activada fluorescente (figuras 2-3).

La eficacia de la transducción fue medida como una función de la multiplicidad de infección con la gama MOIs del 1 al 1000. Los resultados de la transducción *in vitro* de un número de líneas de células humanas demuestran una correlación positiva entre MOI y eficacia de transducción, dado que la mayor parte de las células fueron transducidas con un número creciente de partículas lentivirales (figura 2).

Se examinó la capacidad del vector lentiviral para transducir células no divisoras. Células epiteliales de pigmento retinal humano fueron transducidas mediante vectores virales de leucemia lentiviral o de murina. Las células eran mitóticamente inactivas (confluentes) o mitóticamente activas (crecientes) en el momento de la exposición al vector. Los resultados mostrados en la figura 4 demuestran una capacidad superior de los vectores lentivirales sobre otros vectores retrovirales para transducir células no divisoras. El vector lentiviral fue también altamente eficiente en la transducción de células fetales humanas en comparación con los vectores retrovirales no lentivirales (figura 6).

Para determinar la duración de la expresión de transgén de eGFP, las células transducidas por el vector lentiviral fueron probadas durante un período de 120 días. Los resultados del análisis de Mancha Southern sobre poblaciones clonales de células transducidas indican que el vector de eGFP lentiviral estaba integrado en el genoma anfitrión (figura 5B). La expresión del transgén de eGFP integrado fue estable durante 120 días y no confirió ninguna ventaja selectiva para, o contra, las células transducidas (figura 5A).

Ejemplo 4

Transducción de córnea *in situ*

Los botones corneales humanos obtenidos en el momento de la cirugía de trasplante de córnea, fueron utilizados para demostrar la capacidad de los vectores lentivirales para transducir estas células mitóticamente inactivas con gen de proteína de fluorescencia verde potenciado con gen marcador (figura 7). Las células endoteliales unidas a la membrana de Descemet fueron peladas del tejido de córnea transducido, y examinadas mediante luz y microscopía fluorescente. El endotelio corneal fue positivo en cuanto a eGFP, lo que indica que se alcanzó una transferencia y una expresión de gen eficientes (figura 7B). La transducción eficiente *in situ* y la expresión de eGFP en la capa epitelial, fueron también observadas (figura 7C).

Como conclusión, estos resultados indican que un vector lentiviral deficiente en replicación está capacitado para transferir transgén eficientemente a células endoteliales y epiteliales de córnea humana *in situ*, y conseguir expresión de transgén a largo plazo. Este vector podría ser útil en el tratamiento de desórdenes endoteliales o epiteliales de córnea y puede ser aplicado para modificar la distribución genética de un tejido de córnea de donante *ex vivo* con anterioridad al trasplante de tal manera que module permanentemente el proceso de rechazo de un aloinjerto.

Ejemplo 5Terapia supresora de crecimiento para enfermedad proliferativa ocular

El gen de periferina humano fue utilizado como un ejemplo de gen terapéutico. Se sabe que la deficiencia genética de gen de periferina en los humanos da como resultado una amplia diversidad de fenotipos de inhabilitación. El tejido retinal humano normal o epitelial de pigmento retinal (RPE) extirpado quirúrgicamente en el momento de la enucleación para el retinoblastoma, fue expuesto a vectores lentivirales que o bien carecían de un gen terapéutico o bien contenían un gen de periferina humano. Los resultados de la figura 8 demuestran que el gen de periferina fue transferido eficazmente al tejido de retina humana por medio del vector lentiviral.

Según otro ejemplo de transferencia de gen terapéutico, se utilizó la forma constitutivamente activa del gen de retinoblastoma (CA-rb). El vector lentiviral descrito en la presente memoria medió la transferencia eficiente de la forma constitutivamente activa del gen de retinoblastoma (figura 9). El gen de CA-rb transferido presentó efectos inhibitorios dependiente de la dosis sobre la proliferación de células coroidales y de retina humanas (figura 10) y de células epiteliales de lente humana (figura 11).

La forma constitutivamente activa del gen de retinoblastoma transferido mediante el vector lentiviral inhibió también la proliferación celular intraocular *in vivo*. Dos modelos de enfermedad proliferativa intraocular (vitreoretinopatía proliferativa y opacificación capsular posterior de extracción post-lente) fueron examinados *in vivo*. La vitreoretinopatía proliferativa fue inducida en tres conjuntos de conejos (figura 2). Un conjunto no fue tratado, un conjunto fue tratado con vectores lentivirales que carecían del gen CA-rb, y el último conjunto fue tratado con CA-rb lentiviral suministrado intravitrealmente. La vitreoretinopatía proliferativa y el desprendimiento de retina fueron observados en los dos primeros conjuntos con una frecuencia alta (>90%), mientras que la fracción de animales que experimentaron desprendimiento de retina fue significativamente más baja en el conjunto tratado con CA-rb (26%).

Los resultados mostrados en la figura 13 demuestran el efecto inhibitorio *in vivo* del CA-rb lentiviral sobre el proceso de opacificación capsular posterior de extracción post-lente. Tres conjuntos de conejos fueron sometidos a facoemulsificación estándar para extraer la lente cristalina natural. El primer conjunto (grupo 1) no fue tratado posteriormente con nada y los dos segundos conjuntos fueron tratados ya sea con formaciones lentivirales vacías (sin ningún gen terapéutico, grupo 2) o ya sea con CA-rb lentiviral (grupo 3) suministrado a la bolsa capsular de lente intacta en el momento del cierre de la herida de catarata. Los animales fueron examinados en serie respecto a la presencia de opacificación capsular posterior. La presencia de opacificación fue graduada en una escala de 1 a 5 en la que 1 representaba ninguna opacificación y 5 representaba una opacificación suficientemente severa como para impedir la visualización de la retina con oftalmoscopia binocular indirecta. No existieron resultados estadísticamente diferentes entre los grupos 1 y 2 (ningún tratamiento y vector vacío), mientras que se observó un llamativo efecto inhibitorio del CA-rb lentiviral sobre el desarrollo de opacificación de cápsula posterior. En el día 28, los animales de control tenían una puntuación de opacificación media de 4,4 mientras que los animales tratados con CA-rb lentiviral tenían una puntuación de opacificación media de 2,1.

Ejemplo 6Vector lentiviral de "dos genes"

Se construyó un nuevo vector lentiviral que incorporaba un elemento de IRES (sitio de entrada de ribosoma interno) entre dos sitios de clonación. El elemento de IRES permite el enlace de mRNA-ribosoma y la síntesis de proteína. Este esqueleto puede albergar dos genes expresables diferentes. Se produce un único mensaje en las células transducidas; sin embargo, debido al elemento de IRES, este mensaje es funcionalmente bi-cistónico y puede activar la síntesis de dos proteínas diferentes. De esta forma, cada uno de los genes potencialmente terapéuticos

5 discutidos en lo que antecede puede ser enlazado a un gen marcador (por ejemplo, el gen fluorescente verde potenciado – gen eGFP) de modo que las células transducidas sean marcadas simultáneamente y estén capacitadas para expresar el gen terapéutico de interés. Las células marcadas pueden ser aisladas fácilmente *in vitro* y observadas *in vivo*. Los mapas genéticos para un número de vectores lentivirales que portan diversos genes terapéuticos, han sido mostrados en las figuras 15-31. Puesto que el nivel de experiencia ordinaria de un científico medio en las áreas de ingeniería genética y clonación se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, una persona que tenga una experiencia ordinaria en esta materia podría fácilmente estar capacitada para construir vectores lentivirales que contengan otros genes terapéuticos de interés.

10 Terapia de gen anti-neovascularización

15 Células ingenuas (células que se sabe que no expresan el gen terapéutico), fueron expuestas a los vectores lentivirales mencionados en lo que antecede durante 24 horas. En los dos días siguientes a esta exposición, se aisló el ARN de estas células y se comprobaron en cuanto a expresión transgén mediante reacción de cadena de polimerasa asistida por transcriptasa reversa (RT-PCR). La figura 32 muestra un producto RT-PCR positivo para el gen de fusión de endostatina 18/angiostatina procedente del mRNA aislado a partir de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas.

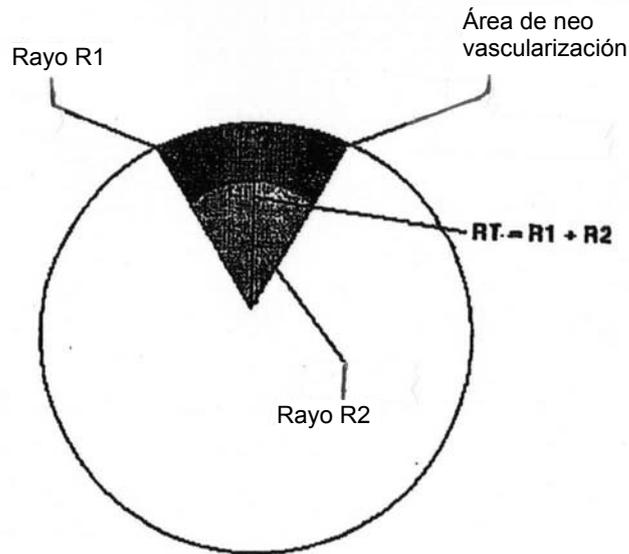
20 A continuación de la demostración de transferencia de gen mediada lentiviral *in vitro* según se ha mostrado en lo que antecede, la capacidad para inhibir la neovascularización *in vivo* fue examinada a continuación. La neovascularización fue inducida en tejidos de córnea de conejo de la siguiente manera:

Creación de una microbolsa intraestromal corneal e inserción de malla de nilón impregnada con lentivirus

25 Se sometieron conejos a anestesia general con isoflourano (4 l/min) y oxígeno (2 l/min) mediante enmascaramiento. Se puso una gota de proparacaína en el fondo del saco para anestesia tópica. El isoflourano se redujo a 2 l/min. Se puso betadina en el fondo del saco durante 30 segundos y enjuagó con BSS (solución salina equilibrada, Alcon Inc.). Un espéculo de párpado fue colocado en el ojo. Se utilizó un microqueratoma de 2,8 mm para introducir el estroma de córnea a las 12 en punto. La incisión intraestromal fue desarrollada en una bolsa intraestromal de 5 x 5 mm con
30 unas pinzas McPherson y un instrumento de barrido de iris, barriendo hacia delante y hacia atrás. La incisión a las 12 en punto fue abierta por un lado cualquiera de modo que la abertura tenía 4,5 mm, con unas tijeras Vannas. Una malla de nilón de hibridación Amersham de 4 x 4 mm (Amersham Bioscientist RPN 2519) impregnada con 10 µl de lentivirus, fue insertada en la bolsa previamente formada. Se puso una gota de tobramicina en la córnea. Se interrumpió el isoflourano y se incrementó el oxígeno nasal hasta 4 l/min. De esta manera, los conejos se sacaron
35 con éxito de la anestesia general después de 20 minutos y se devolvieron a sus jaulas con funciones vitales normales. Los conejos recibieron 0,2 cc de buprenex (0,3 mg/cc) SQ durante dos días para analgesia. Los conejos recibieron también una gota de atropina y una gota de tobramicina durante dos días para cicloplejía post-operatoria y cuidados con antibióticos. El primer día post-operatorio, cada conejo recibió una gota de proparacaína tópica para anestesia y la malla de nilón fue extraída de la bolsa intraestromal de córnea con unas pinzas del 12. El cuidado y el
40 control del dolor quirúrgico post-operatorio fueron monitorizados diariamente durante dos semanas.

Neovascularización inducida alcalina

45 Dos semanas después de la cirugía inicial, las córneas fueron expuestas a discos de filtro Whatman #3 de 6 mm saturados con 20 µl de NaOH 1,0 M durante 1 minuto. Todas las córneas fueron lavadas copiosamente con BSS. Los conejos recibieron una gota de atropina y una gota de tobramicina durante dos días para cicloplejía post-operatoria y cuidados con antibióticos. Se llevó a cabo foto-documentación digital para registrar la respuesta neovascular. La respuesta neovascular fue medida mediante examen con lámpara de hendidura, tomando nota de las horas de reloj y de la longitud de los vasos en los días 1, 3, 5, 7 y 10 post-trauma. La neovascularización fue
50 cuantificada mediante cálculo del área de crecimiento de vaso según se ha descrito abajo.



5 Para un método estandarizado de evaluación respecto a neovascularización de la córnea, se idearon el protocolo y la fórmula que siguen, para registrar y comparar la neovascularización después de la quema alcalina. La fórmula para el área de neovascularización se deduce calculando el área del sector más grande enlazado por el radio RT y restando el sector más pequeño enlazado por el radio $R2$. El área del sector más grande enlazado por el radio RT es el número de horas de reloj dividido por 12 y multiplicado por πRT^2 . El área del sector más pequeño enlazado por el radio $R2$ es el número de horas de reloj dividido por 12 y multiplicado por $\pi(R2)^2$. El área resultante deducida de la sustracción de los dos sectores, podría ser el área de neovascularización.

10 Se realizó microscopía confocal para documentar la expresión de proteína fluorescente verde potenciada, el gen marcador incluido en el mensaje bi-cistrónico lentiviral. La figura 33 muestra microfotografías que demuestran la presencia de eGFP en el interior de la microbolsa corneal en animales tratados con el vector lentiviral.

15 Para demostrar un efecto inhibitorio sobre la neovascularización, se indujo neovascularización en animales según se ha descrito en lo que antecede. Tras el tratamiento con vector lentiviral que contenía un gen de fusión de Mig/IP10, se observó un efecto inhibitorio (figura 34). Según se muestra en la tabla 1, se observó una reducción significativa de la neovascularización en animales tratados con el gen de fusión de Mig/IP10 o con un gen Kringle 1-5 transferido por medio de los vectores lentivirales.

20 Tabla 1
Inhibición de neovascularización después de transferencia de gen lentiviral

Gen	mm ² de neovascularización Animales tratados	mm ² de neovascularización Animales no tratados
Gen de fusión de Mig/IP10	57 mm ²	132,2 mm ²
Kringle 1-5	0,9 mm ²	17,0 mm ²

Las referencias siguientes han sido citadas en la presente memoria:

25 Naldini et al., (1996) Science 272: 263-267

Miyoshi et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94; 10319-10323

30 Cualquiera de las patentes y publicaciones mencionadas en la presente descripción, son indicativas de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Además, estas patentes y publicaciones se incorporan en la presente memoria por referencia en la misma medida en que cada publicación individual haya sido indicada específica e individualmente para ser incorporada por referencia.

35 Un experto en la materia podrá apreciar fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y alcanzar los fines y ventajas mencionados, así como los objetos, fines y ventajas inherentes a los mismos. Los presentes ejemplos, junto con los métodos, procedimientos tratamientos, moléculas y compuestos específicos descritos en la presente memoria, son actualmente representativos de realizaciones preferidas.

REIVINDICACIONES

1. Un vector lentiviral recombinante que comprende un primer gen terapéutico que reduce o inhibe la angiogénesis ocular para uso en el tratamiento de degeneración macular relacionad con la edad en un individuo, en el que dicho primer gen terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en endostatina, angiostatina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de hemopexina de terminal C de la metaloproteinasa-2 matriz, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, la monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), la proteína 10 inducible por interferón alfa (IP10), FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 similar a fms), y el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR).
2. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica la endostatina.
3. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica la angiostatina.
4. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica la endostatina XVIII.
5. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica la endostatina XV.
6. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica el dominio de hemopexina de terminal C de la metaloproteinasa-2 matriz.
7. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica el dominio kringle 5 de plasminógeno humano.
8. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica Mig.
9. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica IP10.
10. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica FLT-1 soluble.
11. El vector lentiviral de la reivindicación 1, en el que dicho primer gen terapéutico codifica KDR.
12. El vector lentiviral de la reivindicación 1, que comprende además un segundo gen terapéutico que inhibe la angiogénesis, en el que dicho segundo gen terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en endostatina, angiostatina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de hemopexina de terminal C de la metaloproteinasa-2 matriz, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, la monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), la proteína 10 inducible por interferón alfa (IP10), FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 similar a fms), y el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR), y en el que el vector lentiviral codifica una proteína de fusión que comprende una primera secuencia de aminoácidos codificada por el primer gen terapéutico y una segunda secuencia de aminoácidos codificada por el segundo gen terapéutico.
13. El vector lentiviral de la reivindicación 1, que comprende además un segundo gen terapéutico que inhibe la angiogénesis, en el que dicho segundo gen terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en endostatina, angiostatina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de hemopexina de terminal C de la metaloproteinasa-2 matriz, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, la monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), la proteína 10 inducible por interferón alfa (IP10), FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 similar a fms), y el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR) y en el que el vector lentiviral comprende un elemento de IRES (sitio de entrada de ribosoma interno) entre dicho primer gen terapéutico y dicho segundo gen terapéutico de manera que se producen, a partir de un único transcrito, una primera secuencia de aminoácidos codificada por el primer gen terapéutico y una segunda secuencia de aminoácidos codificada por el segundo gen terapéutico.
14. El vector lentiviral de la reivindicación 12, que comprende además un ligante entre la primera secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de aminoácidos.
15. El vector lentiviral de la reivindicación 12, en el que el vector lentiviral codifica una proteína de fusión de la endostatina XVIII y la agiostatina.
16. El vector lentiviral de la reivindicación 12, en el que el vector lentiviral codifica una proteína de fusión de la endostatina XVIII y el dominio kringle 5 de plasminógeno humano.
17. El vector lentiviral de la reivindicación 12, en el que el vector lentiviral codifica una proteína de fusión de Mig e IP10.
18. Uso de un vector lentiviral que comprende un gen terapéutico que reduce o inhibe la angiogénesis ocular en la fabricación de un medicamento para inhibir la neovascularización en un individuo que tiene una degeneración macular relacionada con la edad, en el que dicho gen terapéutico se selecciona del grupo que consiste en

- endostatina, angiostatina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de hemopexina de terminal C de la metaloproteínasa-2 matriz, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, una proteína de fusión de endostatina y angiostatina, una proteína de fusión de endostatina y del dominio kringle 5 de plasminógeno humano, la monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), la proteína 10 inducible por interferón alfa (IP10), una proteína de fusión de la Mig y la IP10, FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 similar a fms), y el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR).
- 5
19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el vector lentiviral es un vector lentiviral como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
20. Uso de la reivindicación 18, en el que dicho vector lentiviral es administrado en una dosis de entre alrededor de 10^6 y 10^9 partículas de transducción en el espacio capsular, vítreo o sub-retinal.
- 10
21. Un método para transducir ex vivo tejido corneal con un gen terapéutico, que comprende exponer una célula corneal que forma parte de un tejido corneal a un vector lentiviral recombinante que comprende dicho gen terapéutico acoplado operativamente a un promotor que se conoce que es activo en células corneales, en el que el gen terapéutico se selecciona del grupo que consiste en endostatina, angiostatina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de hemopexina de terminal C de la metaloproteínasa-2 matriz, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, la monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), la proteína 10 inducible por interferón alfa (IP10), FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 similar a fms), y el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR).
- 15
22. Un tejido corneal que comprende células transducidas con un vector lentiviral recombinante, en el que el vector lentiviral recombinante comprende un primer gen terapéutico acoplado operativamente a un promotor que se conoce que es activo en células corneales, y en el que el gen terapéutico está seleccionado del grupo que consiste en endostatina, angiostatina, endostatina XVIII, endostatina XV, el dominio de hemopexina de terminal C de la metaloproteínasa-2 matriz, el dominio kringle 5 de plasminógeno humano, la monoquina inducida por interferón-gamma (Mig), la proteína 10 inducible por interferón alfa (IP10), FLT-1 soluble (receptor de tirosina quinasa 1 similar a fms), y el receptor de dominio de inserción de quinasa (KDR).
- 20
23. El tejido corneal de la reivindicación 22, en el que las células están transducidas con un vector lentiviral como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 1-17.
- 25
24. El tejido corneal de la reivindicación 22, en el que el tejido corneal es tejido corneal humano.
25. Un tejido corneal como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 22-24 para uso en el tratamiento de la neovascularización corneal en un individuo.
- 30
26. El tejido corneal de la reivindicación 25, en el que el tejido corneal se transduce in situ.

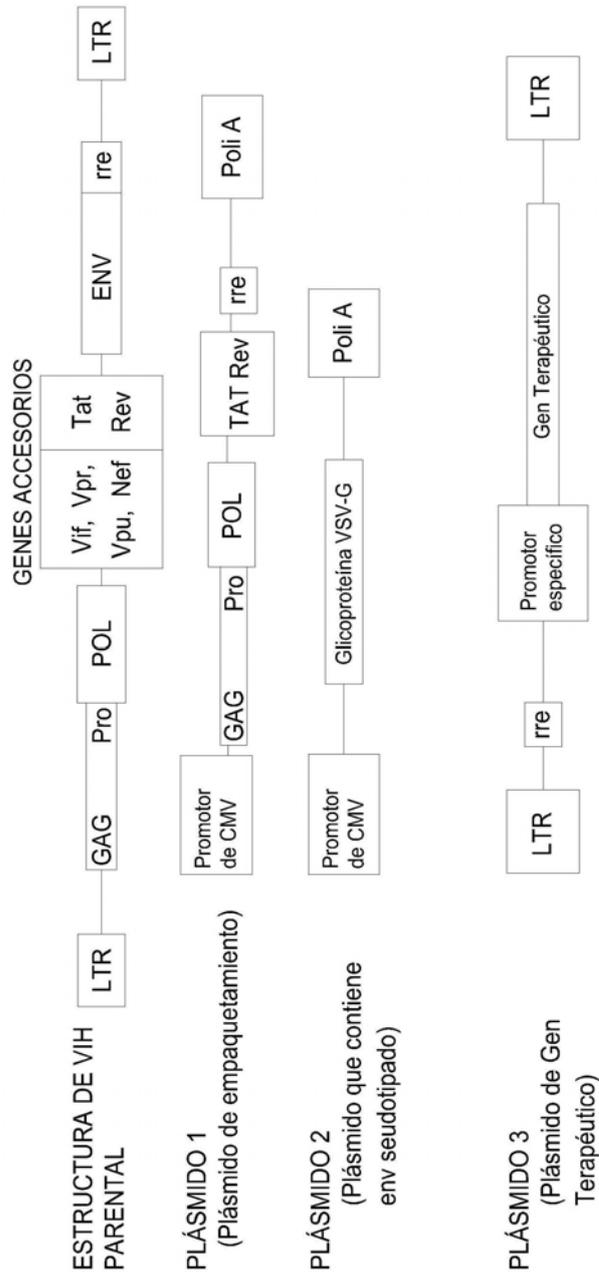
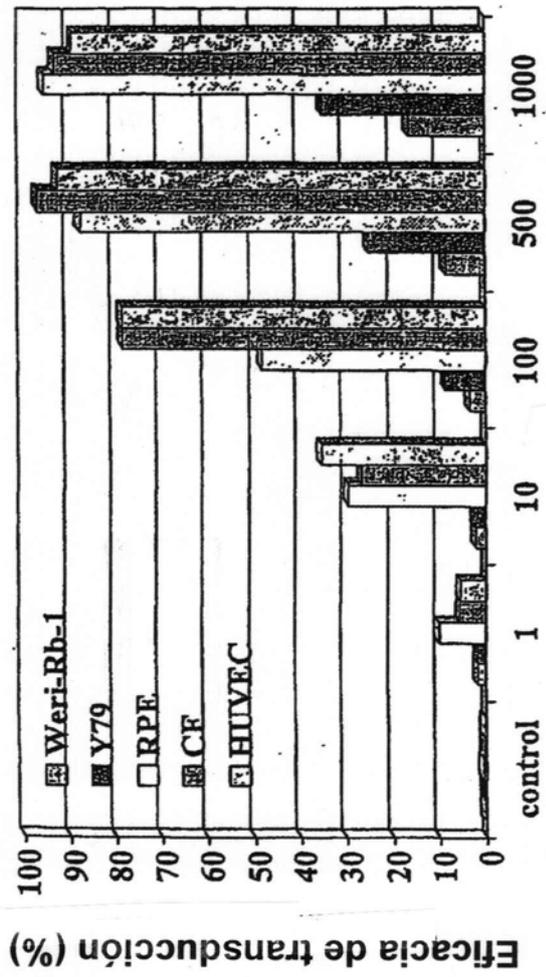


Fig. 1



Multiplicidad de infección (MOI)

Fig. 2



Fig. 3A

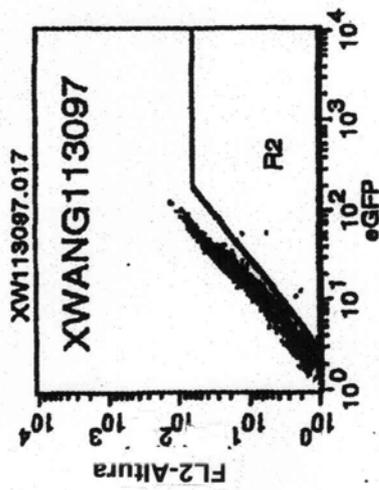
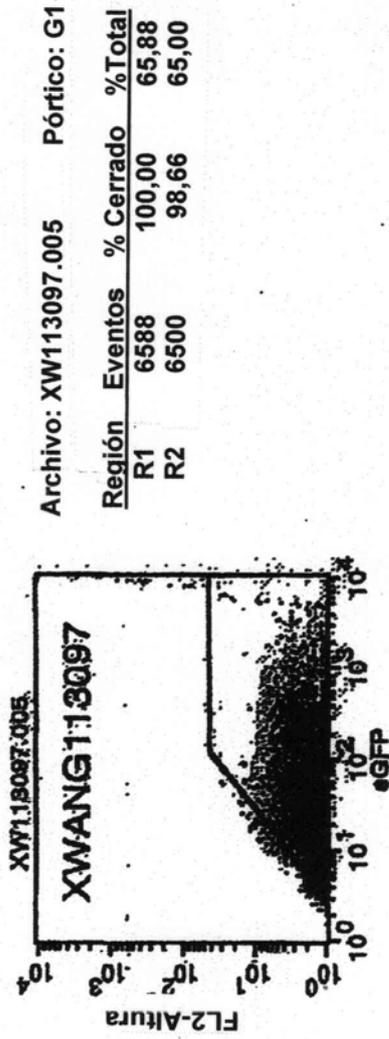


Fig. 3B

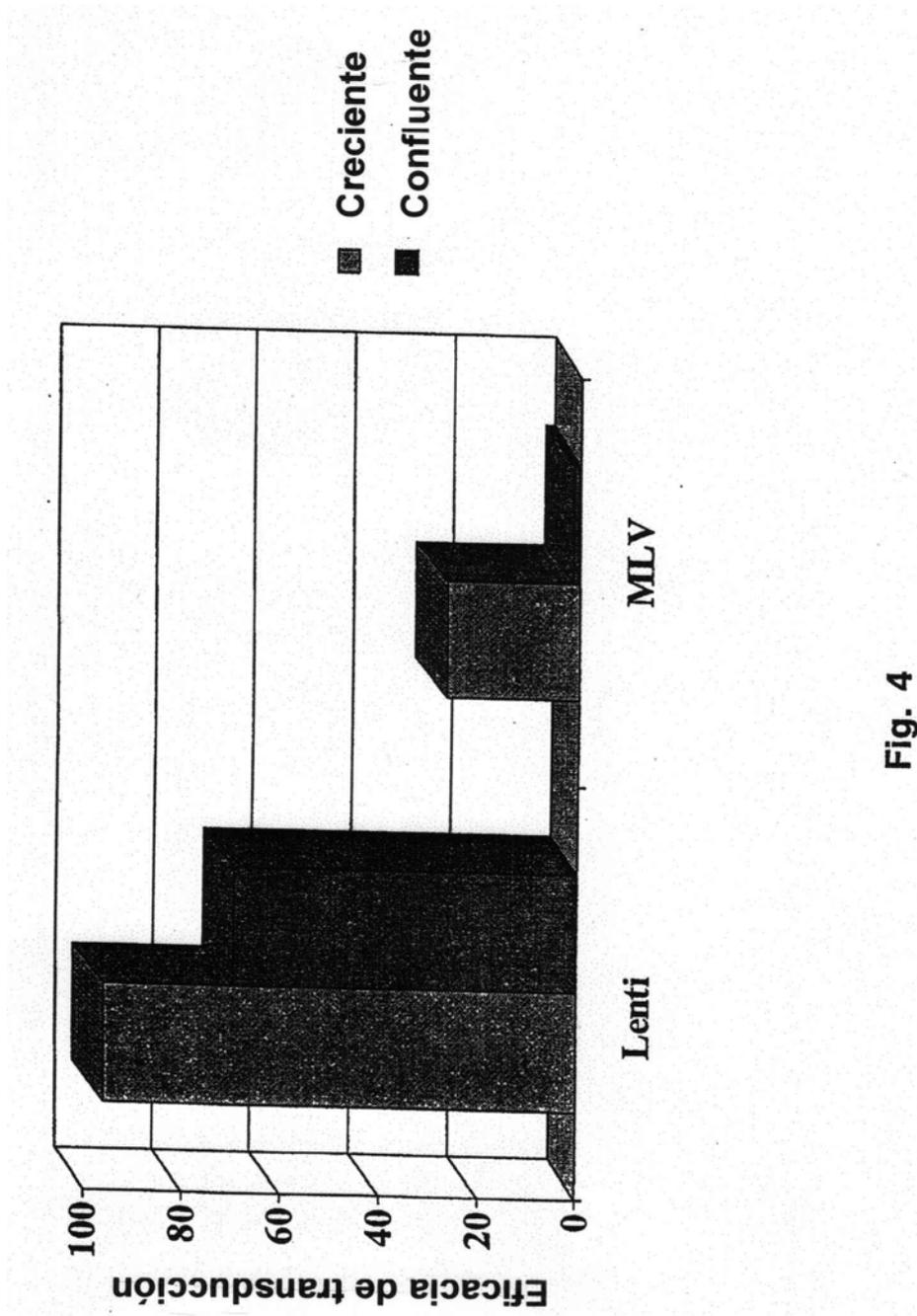


Fig. 4

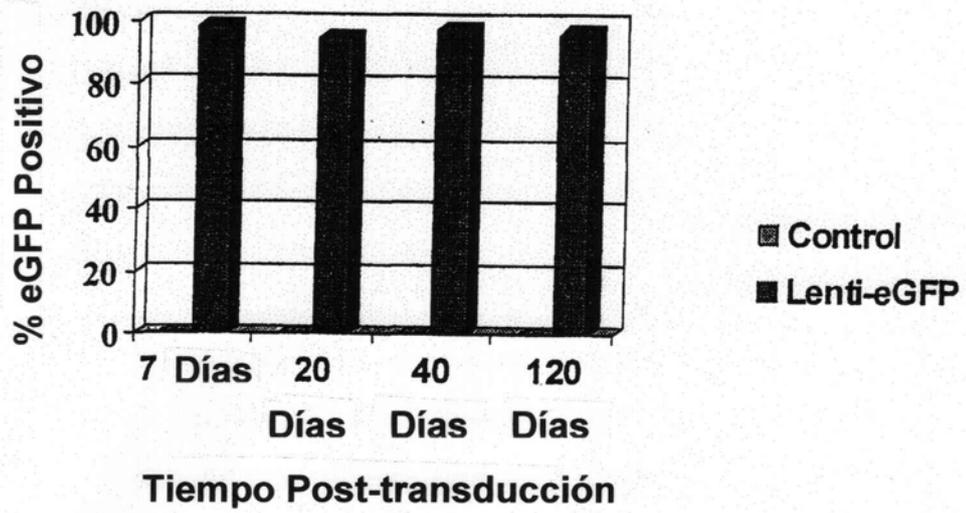


Fig. 5A

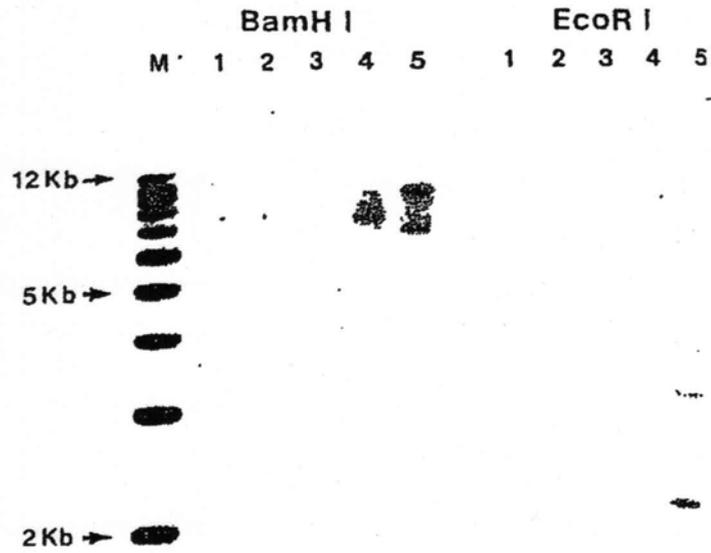


Fig. 5B

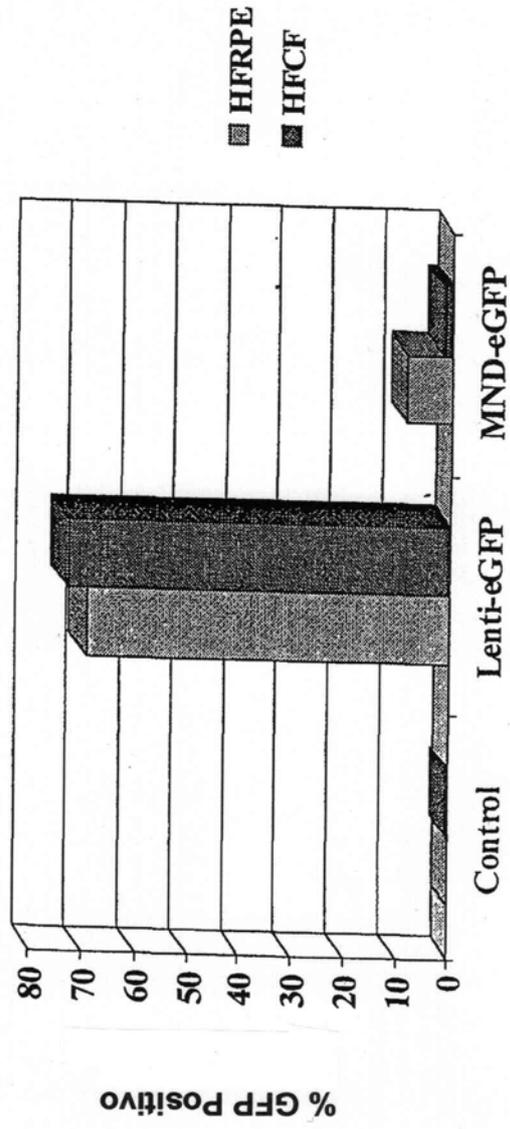


Fig. 6

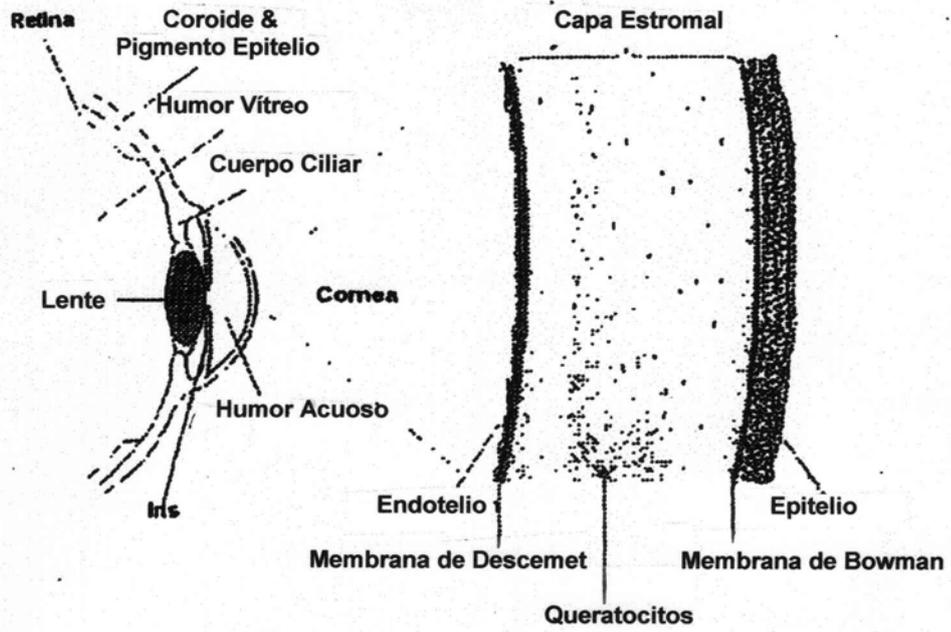


Fig. 7A

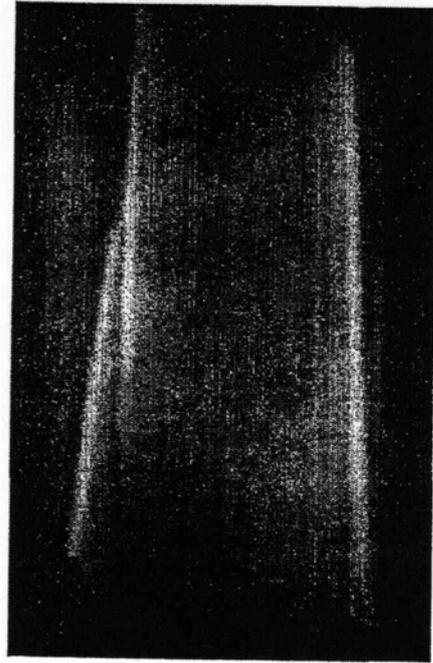


Fig. 7B

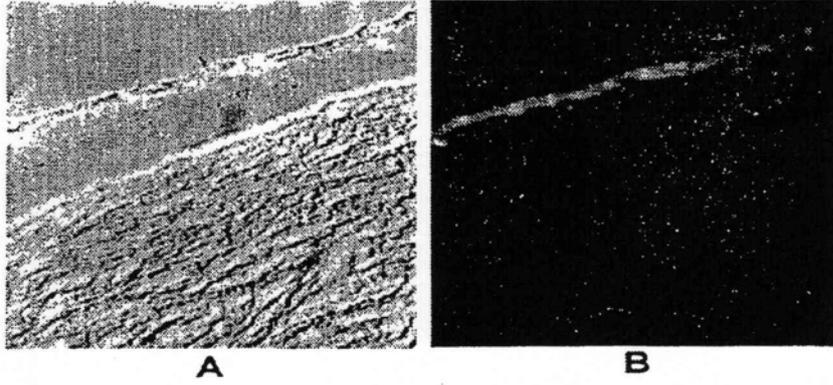


Fig. 7C

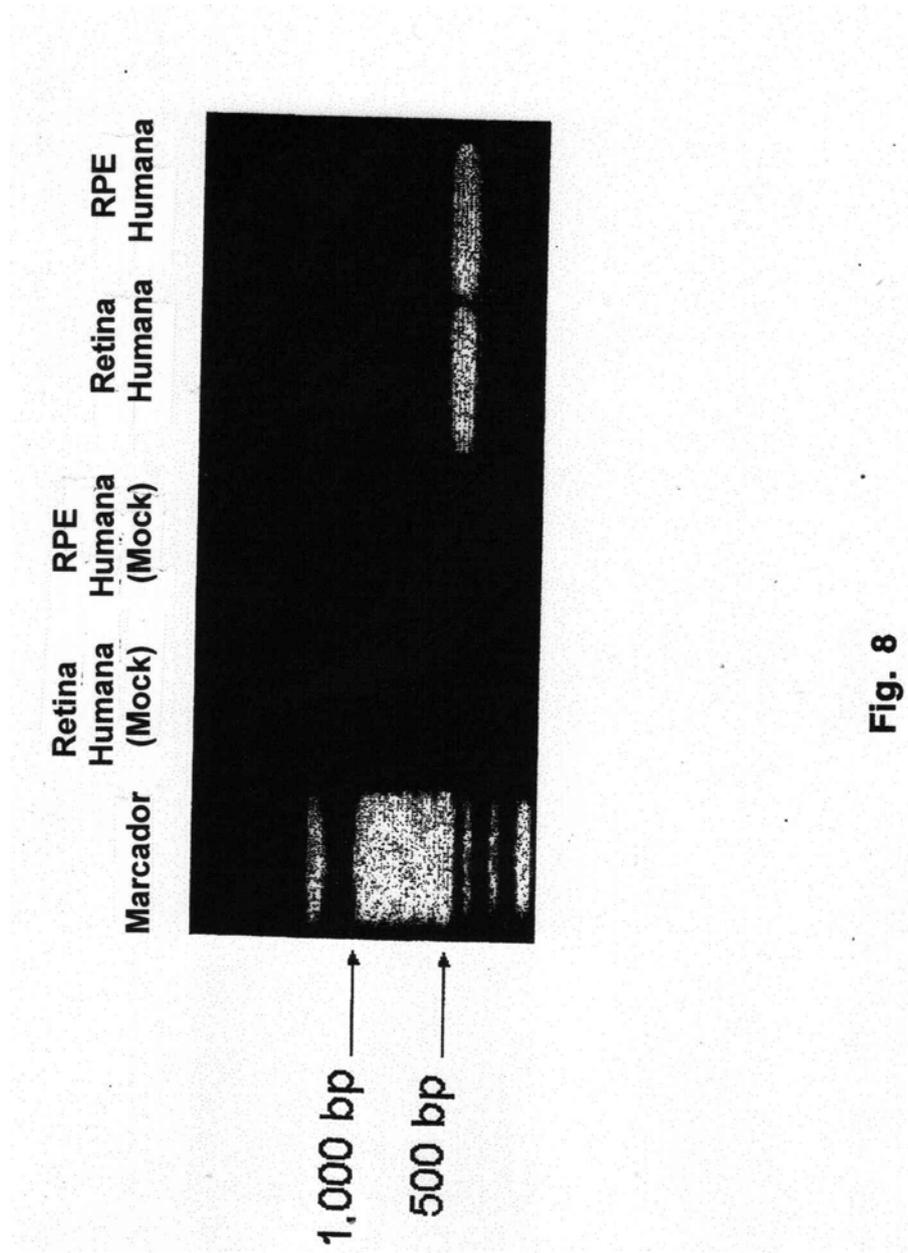


Fig. 8

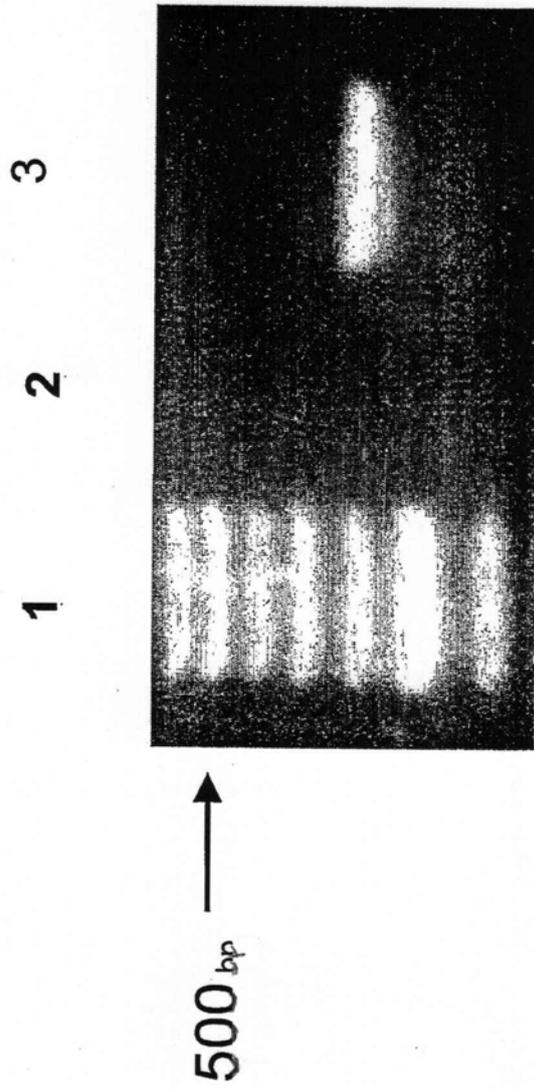


Fig. 9

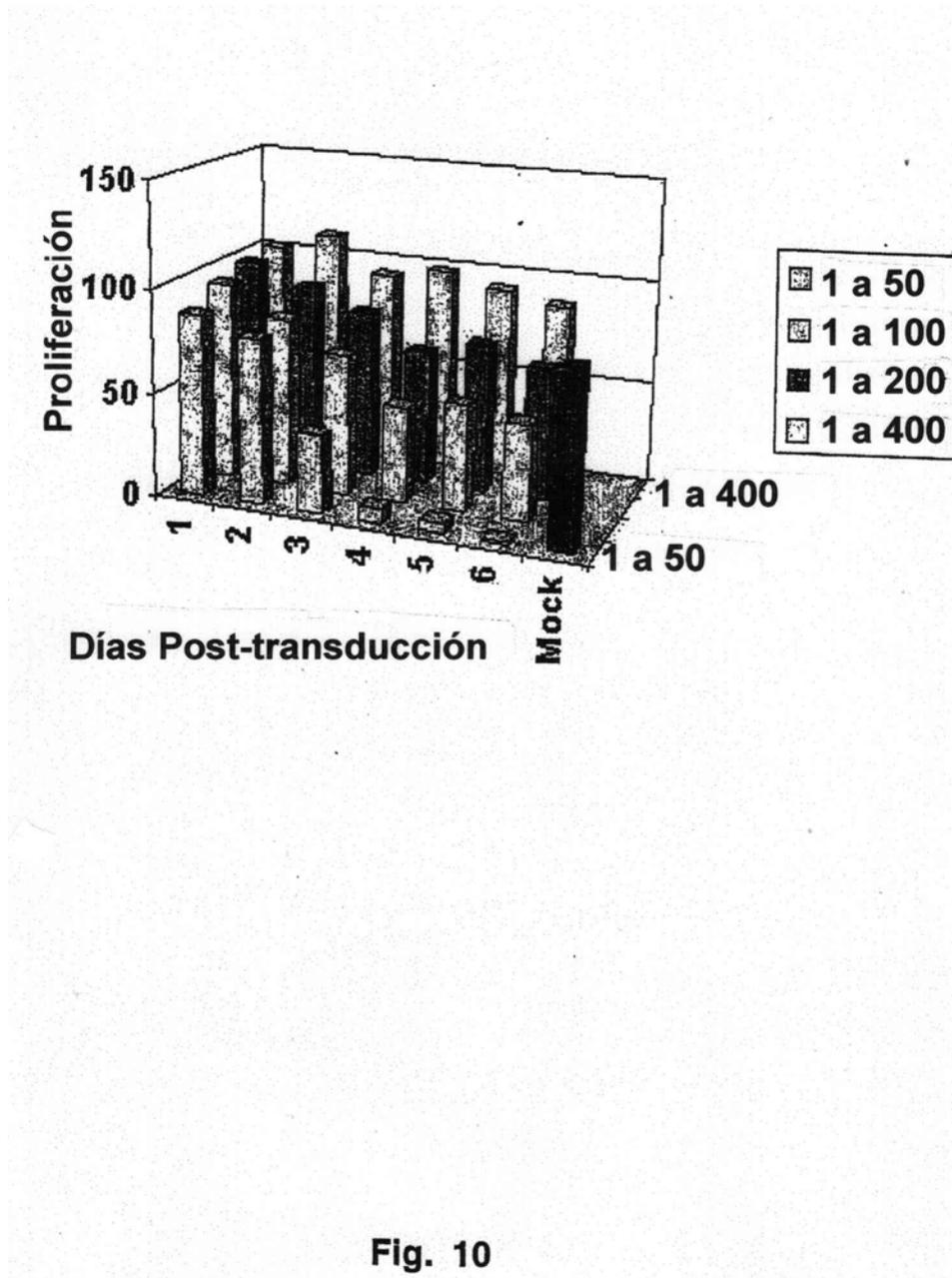


Fig. 10

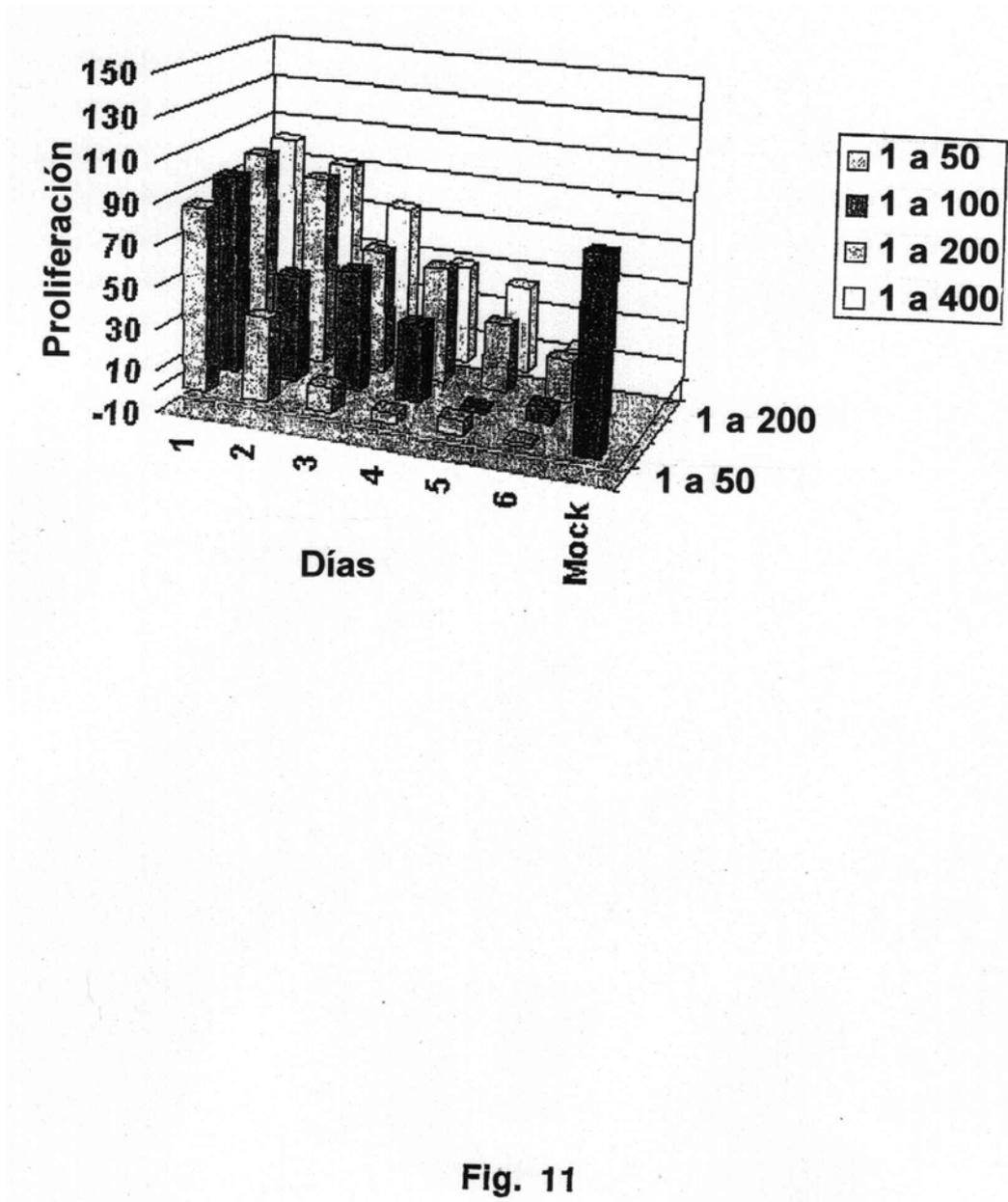


Fig. 11

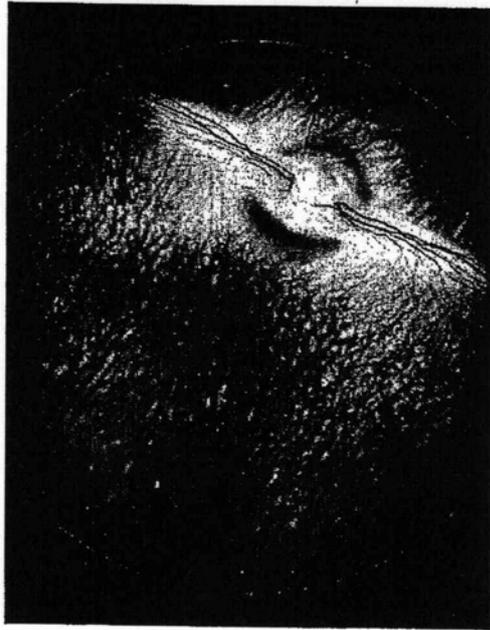


Fig. 12