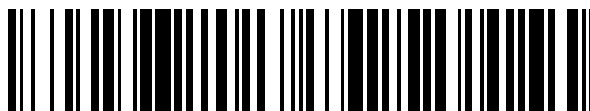


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 364**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2008 E 08747407 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2145189**

54 Título: **Pseudovirus de papilomavirus para detección y terapia de tumores**

30 Prioridad:

08.05.2007 US 928495 P

14.02.2008 US 65897

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

28.06.2016

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)**

**Office of Technology Transfer National Institutes
of Health 6011 Executive Boulevard Suite 325
MSC 7660
Bethesda, Maryland 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**ROBERTS, JEFF;
LOWY, DOUGLAS, R. y
SCHILLER, JOHN, T.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 575 364 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

Pseudovirus de papilomavirus para detección y terapia de tumores

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a los campos de biología molecular y medicina. Más específicamente, se describen en este documento métodos para detectar tumores y tratar sujetos que padecen usando pseudovirus de papiloma y partículas tipo virus (VLP).

10

Antecedentes de la invención

El cáncer se diagnostica en más de 1 millón de personas cada año en los Estados Unidos solamente. A pesar de los numerosos avances en la investigación médica, el cáncer sigue siendo la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, representando casi 1 de cada cuatro muertes. Aunque están disponibles numerosos tratamientos para diversos cánceres, muchas formas de cáncer siguen siendo incurables, intratables, y/o se vuelven resistentes a terapias convencionales. Por ejemplo, los tumores pueden ser inoperables a causa de su localización o pueden metastatizar, haciendo difícil o imposible tratar la enfermedad. Las terapias actuales tienen considerables inconvenientes. Por ejemplo, la radioterapia puede causar daño en las superficies epiteliales, hinchamiento, infertilidad, fatiga, fibrosis, pérdida del cabello, sequedad, y cáncer. La quimioterapia puede inducir náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, anemia, malnutrición, pérdida de cabello, pérdida de memoria, depresión del sistema inmunológico y por tanto infecciones y sepsis, hemorragia, neoplasias secundarias, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, y ototoxicidad. Es muy evidente la necesidad de técnicas robustas para diagnosticar y tratar el cáncer.

15

20

25

Los virus han demostrado tener tremenda utilidad en diversas aplicaciones biomédicas. Muchas de estas técnicas aprovechan la capacidad única de los virus de entrar en células con alta eficacia. Algunas de estas aplicaciones explotan la expresión génica vírica y la replicación para inducir expresión de un heterólogo insertado. Es bien sabido que diversos virus suministra y expresa genes en células (víricos u otros genes), que pueden ser útiles, por ejemplo, en terapia génica, el desarrollo de vacunas, o biología del cáncer.

30

Existe documentación extensiva sobre el uso de vectores víricos, particularmente aquellos basados en adenovirus, virus adenoasociados (AAV), herpes virus y retrovirus, para aumentar la potencia de la terapia antitumoral, sin embargo, estas metodologías están en su albor.

35

Nieland et al, *Journal of Cellular Biochemistry* 73:145-152 (1999), describe partículas tipo virus de papilomavirus quimérico que inducen una respuesta inmunitaria protectora específica de autoantígeno murino y antitumoral terapéutica. Schiller y Lowry, *Expert Opinion On Biological Therapy*, vol. 1, n.º 4, 1 julio de 2001 páginas 571-581, describen vacunas basadas en partículas tipo papilomavirus. Cho et al, *Cancer Letters* 162 (2001) 75-85 describen la mejora de la transferencia génica de líneas celulares de cáncer cervical usando agentes no víricos. Touze y Coursaget, *Nucleic Acids Research*, 1998, Vol. 26, N.º 5, 1317-1323, describen transferencia génica *in vitro* usando partículas tipo papilomavirus humano.

40

Sumario de la invención

45

En un aspecto, la invención proporciona un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma que comprende un marcador detectable para su uso en método de detección de la presencia de células cancerosas en un sujeto que tiene o es sospecho de tener células cancerosas: donde dicho método comprende: identificar un sujeto que tiene o es sospechoso de tener células cancerosas; administrar a dicho sujeto una cantidad detectable de dicho pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma que comprende un marcador detectable; y detectar la presencia de células cancerosas unidas a dicho pseudovirus de papiloma o dicha VLP de papiloma que comprende un marcador detectable.

50

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un agente terapéutico formulado con un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso en un método de tratamiento de cáncer inhibiendo la proliferación de células cancerosas y/o eliminando las células cancerosas sin inhibir la proliferación y/o sin eliminar las células normales en un sujeto identificado con un cáncer, donde dicho agente terapéutico es citotóxico para una célula cancerosa.

55

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

60

Realizaciones de la presente descripción se refieren a métodos para detectar la presencia de células cancerosas, (por ejemplo, células tumorales), unidas a al menos un pseudovirus de papiloma (PsV) o partícula tipo virus (VLP) de papiloma. Algunos enfoques implican identificar un sujeto que tiene o es sospechoso de tener células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad detectable de un pseudovirus o VLP de papiloma que comprende un marcador detectable, y detectar la presencia o ausencia de células cancerosas unidas al pseudovirus o VLP de papiloma que comprende el marcador detectable. En algunas realizaciones, el marcador está acoplado químicamente al

65

pseudovirus o VLP. En otras realizaciones, se mide la presencia, ausencia o cantidad de pseudovirus o VLP de papiloma unido a las células cancerosas y la presencia, ausencia o cantidad de pseudovirus o VLP de papiloma unido a células normales. En más realizaciones, el pseudovirus comprende un gen que codifica un marcador (por ejemplo, luciferasa o GFP). Otros marcadores, incluyendo marcadores fluorescentes, radiactivos, o quimioluminiscentes, que pueden incorporarse en o acoplarse al PsV o VLP, también se contemplan para su uso con algunas realizaciones.

Realizaciones adicionales descritas en este documento se refiere a métodos para controlar una terapia contra el cáncer en un sujeto que incluye identificar a un sujeto con un cáncer, proporcionar al sujeto una terapia contra el cáncer, administrar al sujeto una cantidad detectable de un pseudovirus o VLP de papiloma que comprende un marcador detectable, y determinar la presencia o cantidad de PsV o VLP unido a células cancerosas en el sujeto después, o durante el curso del tratamiento con la terapia contra el cáncer. Usando sucesivas inoculaciones con PsV o VLP marcados de forma fluorescente, por ejemplo, puede evaluarse la eficacia a tiempo real de la terapia particular en el tiempo. En algunas realizaciones, el marcador está acoplado químicamente al pseudovirus o VLP. En otras realizaciones, se mide la presencia o cantidad de pseudovirus o VLP de papiloma unido a las células cancerosas y la presencia o cantidad de pseudovirus o VLP de papiloma unido a células normales. En algunas realizaciones, el pseudovirus incluye un gen que codifica el marcador o, opcionalmente, un ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, un ácido nucleico de oligo T).

Más realizaciones descritas en este documento se refieren a métodos de inhibición selectiva de la proliferación de células cancerosas y/o eliminación de células cancerosas sin inhibir la proliferación de y/o eliminar células normales que incluye identificar un sujeto con un cáncer y administrar al sujeto identificado una cantidad inhibidora de una composición que comprende un pseudovirus o VLP de papiloma y un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el agente terapéutico está acoplado químicamente al pseudovirus o VLP de papiloma. En otras realizaciones, el agente terapéutico se incorpora dentro del pseudovirus o VLP de papiloma. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es una toxina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico comprende un ácido nucleico de oligo T. En algunas realizaciones, el agente terapéutico comprende un radionúclido. Realizaciones adicionales descritas en este documento se refieren a kits que incluyen un pseudovirus o VLP de papiloma, vehículos farmacéuticos, e instrucciones para el uso de los componentes del kit.

Por consiguiente, aspectos de la presente descripción se refieren a métodos de detección de la presencia de células cancerosas unidas a un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma que comprende identificar a un sujeto que tiene o es sospechoso de tener células cancerosas; administrar o proporcionar a dicho sujeto una cantidad detectable de un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma que comprende un marcador detectable; y detectar la presencia de células cancerosas unidas a dicho pseudovirus de papiloma o dicha VLP de papiloma que comprende un marcador detectable. En algunas realizaciones, el marcador está acoplado químicamente a dicho pseudovirus o VLP o dicho pseudovirus comprende un gen que codifica dicho marcador y en más realizaciones se mide la presencia o cantidad de pseudovirus o VLP unido a dichas células cancerosas y la presencia o cantidad de pseudovirus o VLP unido a células normales. El marcador usado en estas realizaciones puede ser fluorescente, radiactivo o quimioluminiscente o detectable de otro modo.

Aspectos de la presente descripción también incluyen métodos para evaluar una terapia contra el cáncer que comprende identificar a un sujeto con un cáncer; proporcionar a dicho sujeto una terapia contra el cáncer; administrar o proporcionar a dicho sujeto una cantidad detectable de un pseudovirus de papiloma o VLP de papiloma que comprende un marcador detectable; y determinar la presencia o cantidad de dicho pseudovirus o dicha VLP unida a células cancerosas en dicho sujeto, antes de un tratamiento de dicha terapia contra el cáncer y durante o después de un periodo de dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el marcador está acoplado químicamente a dicho pseudovirus o dicha VLP o dicho pseudovirus comprende un gen que codifica dicho marcador y en algunas realizaciones, se mide la presencia o cantidad de dicho pseudovirus o dicha VLP unida a dichas células cancerosas y la presencia o cantidad de dicho pseudovirus o dicha VLP unida a células normales. El marcador usado puede ser fluorescente, radiactivo, quimioluminiscente o puede marcar de forma detectable de otro modo.

Aspectos de la presente descripción también incluyen métodos de inhibición de la proliferación de células cancerosas y/o eliminación de células cancerosas sin inhibir la proliferación y/o eliminar células normales, que comprende identificar a un sujeto con un cáncer; y administrar o proporcionar a dicho sujeto identificado una composición que comprende un agente terapéutico formulado con un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma. En algunas realizaciones, el agente terapéutico está acoplado químicamente a dicho pseudovirus o dicha VLP y en otras realizaciones el agente terapéutico se incorpora dentro de dicho pseudovirus o dicha VLP. El agente terapéutico puede ser una toxina, radionúclido, ganciclovir o aciclovir, u oligo T, preferiblemente, oligo T, de menos de o igual a 200, 175, 150, 125, 100, 95, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, o 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un ácido nucleico que expresa oligo T y dicho ácido nucleico está unido de forma funcional a un promotor Pol III. En algunas realizaciones, los métodos anteriores se usan para inhibir, eliminar, evaluar, o diagnosticar el estado de un cáncer, que se selecciona del grupo que consiste en leucemia, linfoma, mieloma, plasmacitoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rhabdomioma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama,

cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, neuroglioma, y retinoblastoma.

Aún más realizaciones incluyen kits que comprenden un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma, un vehículo farmacéutico, instrucciones para usar los componentes del kit y método de detección de la presencia de cáncer cervical en un sujeto, que comprende proporcionar a dicho sujeto una composición que comprende una VLP de papiloma acoplada a o que contiene un marcador; retirar las VLP no unidas que comprenden dicho marcador; y detectar la presencia de células cancerosas unidas a dicha VLP que comprende dicho marcador.

En algunas de estas realizaciones, el marcador está químicamente acoplado a dicha VLP y en algunas realizaciones se mide la presencia o cantidad de dicha VLP unida a dichas células cancerosas y la presencia o cantidad de dicha VLP unida a células normales. El marcador puede ser fluorescente, radiactivo, quimioluminiscente o puede marcar de forma detectable de otro modo.

Aspectos de la presente descripción también incluyen una composición que comprende un ácido nucleico que comprende un dominio oligo T de al menos 10 y menos de o igual a 200 restos T consecutivos, tal como un dominio oligo T que consiste esencialmente en 45 nucleótidos o un dominio oligo T que consiste en 45 nucleótidos. Estos ácidos nucleicos o ácidos nucleicos que codifican estas moléculas pueden unirse de forma funcional al promotor Pol III.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1a-1d. Efectos de alteración mecánica, N-9 y carragenina sobre infección por pseudovirus HPV16 de la mucosa cervicovaginal de ratón. Se indican resultados de imágenes multiespectrales (representativas de dos o tres experimentos diferentes), expresados como señal media por píxel, para ratones (seis por grupo) en el eje Y, y se indican geles usados para preparar el inóculo de pseudovirus en el eje X. El método de pretratamiento se indica por la clave. Las barras de error representan el error típico de la media. (Fig. 1a) Comparación de la potenciación de infección por alteración mecánica y química. (Fig. 1b) Protección proporcionada por carragenina cuando se mezcla con el inóculo. (Fig. 1c) Protección proporcionada por lubricantes sin receta cuando se mezclan con el inóculo. (Fig. 1d) Protección proporcionada por carragenina cuando se mezcla con N-9 durante pretratamiento.

Fig. 2. Análisis cuantitativo de infección del tracto reproductor murino. Ratones tratados con Conceptrol se infectaron de forma simulada (parte superior) o se expusieron con pseudovirus HPV-16-tdTomato (parte inferior). Después de 3 días, se diseccionó el tracto reproductor completo y se hizo una incisión sagital en la pared ventral de la vagina y el cuello del útero. (Fig. 2a) Imagen Composite Maestro (epitelio mucoso enfocando hacia arriba) con algoritmo sin mezclas aplicado. La señal roja representa la localización de infección en comparación con la autofluorescencia de fondo. (Fig. 2b) Señal tdTomato no mezclada convertida a escala de grises. El perfil del tejido indica ROI. (Fig. 2c) Análisis de ImageJ. Se computó la señal media por píxel con la ROI.

Fig. 3. El tracto genital intacto de ratón era completamente resistente a infección después de deposición de 10^7 unidades infecciosas pseudovíricas en la vagina o canal endocervical.

Fig. 4. Cápsidas de HPV acopladas a colorante fluorescente verde no unidas a epitelio escamoso o simple que delinea el tracto reproductor femenino de ratón.

Fig. 5. Líneas celulares de tumor epitelial eran permisivas para infección con pseudovirus HPV5 y 16.

Fig. 6. Líneas celulares de tumor no epitelial eran permisivas para infección por pseudovirus HPV5 y 16.

Fig. 7. Diseño experimental para ensayar si los pseudovirus de papiloma infectan preferentemente células tumorales en un modelo de metástasis de tumor peritoneal SHIN3-dsr.

Fig. 8. Pseudovirus HPV16 infecta de forma eficaz y selectiva células de cáncer de ovario implantadas en la membrana peritoneal como se demuestra por imágenes multiespectrales de fluorescencia.

Fig. 9. Diseño experimental para ensayar si pseudovirus de papiloma infectan preferentemente células tumorales en un modelo de metástasis de tumor peritoneal SKOV3.

Fig. 10. Pseudovirus HPV16 infecta de forma eficaz y selectiva células de cáncer de ovario implantadas en la membrana peritoneal como se demuestra por la medición de actividad luciferasa.

Fig. 11. Pseudovirus HPV16 infecta de forma eficaz y selectiva células de cáncer de ovario implantadas en la membrana peritoneal como se demuestra por imágenes multiespectrales de fluorescencia.

Fig. 12. Pseudovirus HPV16 infecta de forma eficaz y selectiva células de cáncer de ovario implantadas en la membrana peritoneal como se demuestra por imágenes multiespectrales de fluorescencia.

Fig. 13. Pseudovirus HPV16 infecta de forma eficaz y selectiva células de cáncer de ovario implantadas en la membrana peritoneal como se demuestra por imágenes multiespectrales de fluorescencia.

Descripción detallada de la invención

Se describe en este documento el inesperado descubrimiento de que pseudovirus de papiloma y VLP de papiloma se unen selectivamente a e infectan células cancerosas pero no células normales. Aunque sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna o crear un impedimento de ese modo, se contempla que, en comparación con los vectores de transferencia génica vírica actuales, los pseudovirus y VLP de papiloma ofrecen inesperadamente muchos beneficios. Los pseudovirus y VLP de papiloma no quedarán implicados en interacción competitiva con células normales, que puede impedir el suministro eficaz de los vectores víricos a las células cancerosas. La incapacidad de los pseudovirus y VLP de papiloma de unirse a células normales en tejidos intactos (por ejemplo, no transformados o no cancerosos) también minimizará la citotoxicidad del tratamiento. Además, como los pseudovirus y VLP de papiloma eliminan preferentemente células cancerosas, inducirán preferentemente una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas. Finalmente, los pseudovirus y/o VLP para muchos tipos de papilomavirus pueden generarse rápidamente y los anticuerpos neutralizantes de papilomavirus están restringidos en tipo. Por consiguiente, la inhibición mediada por anticuerpo neutralizante y el refuerzo con pseudovirus o VLP de papiloma homólogo puede superarse por el uso de pseudovirus o VLP de papiloma de otro tipo.

Como se describe en este documento, se pretende que cuando se proporciona un intervalo de valores, se entienda que cada valor intermedio, a partir del décimo de la unidad del límite inferior salvo que el contexto indique claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior del intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en el intervalo indicado esté englobado dentro de las realizaciones. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños también englobados dentro de las realizaciones, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, intervalos que excluyen cualquiera de estos dos límites incluidos también se incluyen en las realizaciones.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado habitualmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenecen las realizaciones. Aunque también puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de las realizaciones, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en este documento son para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

Las publicaciones analizadas en este documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe entenderse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a antedatar dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas reales de publicación que no necesitan estar confirmadas independientemente.

Debe indicarse que como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, referencia a "un método" incluye una pluralidad de dichos métodos y referencia a "una dosis" incluye referencia a una o más dosis y equivalentes de las mismas conocidas para los expertos en la materia, y etc.

En algunos contextos, los términos "individuo", "hospedador", "sujeto", y "paciente" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un animal que es el objeto de tratamiento, observación y/o experimento. "Animal" incluye vertebrados e invertebrados, tales como peces, crustáceos, reptiles, pájaros, y, en particular, mamíferos. "Mamífero" incluye, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, caballos, primates, tales como monos, chimpancés, y simios, y, en particular, seres humanos.

En algunos contextos, los términos "mejorar", "tratar", "tratamiento", "terapéutico", o "terapia" no significan necesariamente cura o eliminación total de la enfermedad o afección. Cualquier alivio de cualquier signo o síntoma indeseado de una enfermedad o afección, a cualquier grado, puede considerarse mejora, y en algunos aspectos un tratamiento y/o terapia. Además, tratamiento puede incluir actos que pueden empeorar la sensación global del paciente de bienestar o aspecto.

La expresión "cantidad/dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad inhibidora" se usa para indicar una cantidad de un compuesto activo, o agente farmacéutico, que provoca una respuesta biológica o medicinal. Esta respuesta puede aparecer en un tejido, sistema, animal o ser humano e incluye alivio de los síntomas de la enfermedad que se está tratando. Como se usa en este documento con respecto a vectores pseudovíricos de la invención, la expresión "cantidad/dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad/dosis de un vector o composición farmacéutica que contiene al vector que es suficiente para producir una respuesta antitumoral eficaz tras la administración a un sujeto.

La expresión "ácidos nucleicos", como se usa en este documento, puede ser ADN o ARN. Los ácidos nucleicos también pueden incluir nucleótidos modificados que permiten la lectura correcta a través de una polimerasa y que no alteran la expresión de un polipéptido codificado por ese ácido nucleico. Las expresiones "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a una molécula que comprende múltiples

nucleótidos. Como se usan en este documento, las expresiones se refieren a oligorribonucleótidos así como oligodesoxirribonucleótidos. Las expresiones también incluirán polinucleósidos (es decir, un polinucleótido menos el fosfato) y cualquier otro polímero que contenga base orgánica. Los ácidos nucleicos incluyen vectores, por ejemplo, plásmidos, así como oligonucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse a partir de fuentes existentes de ácido nucleico, pero son preferiblemente sintéticas (por ejemplo, producidas por síntesis de oligonucleótidos).

La expresión "secuencia de nucleótidos" incluye las hebras tanto con sentido como antisentido como hebras únicas individuales o en dúplex.

La expresión "secuencia de ácido nucleico codificante" se refiere a un ácido nucleico que dirige la expresión de una proteína o péptido específico. Las secuencias de ácido nucleico incluyen tanto la secuencia de hebra de ADN que se transcribe en ARN como la secuencia de ARN que se traduce en proteína. Las secuencias de ácido nucleico incluyen tanto, secuencias de ácido nucleico de longitud completa, así como secuencias no de longitud completa derivadas de las secuencias de longitud completa. Debe entenderse adicionalmente que la secuencia incluye los codones degenerados de la secuencia o secuencias nativas que pueden introducirse para proporcionar preferencia de codones en una célula hospedadora específica.

Por "ADN" se entiende una forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina, o citosina) en forma bicatenaria o monocatenaria, relajada y superenrollada. Este término solamente se refiere a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no la limita a ninguna forma terciaria particular. Por tanto, este término incluye ADN mono y bicatenario encontrado, entre otros, en moléculas de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos, y cromosomas. En el análisis de la estructura de moléculas particulares de ADN, pueden describirse secuencias en este documento de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra que tiene la secuencia homóloga al ARNm). El término abarca moléculas que incluyen las cuatro bases adenina, guanina, timina, o citosina, así como como moléculas que incluyen análogos de bases que son conocidos en la técnica.

Un "gen" o "secuencia codificante" o una secuencia, que "codifica" una proteína particular es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras o de control apropiadas. Los límites del gen se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Un gen puede incluir, aunque sin limitación, ADNc de ARNm procarionta o eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN procarionta o eucariota, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción habitualmente estará localizada 3' a la secuencia génica.

La expresión "elementos de control" se refiere de forma colectiva a regiones promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores cadena arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma ("IRES"), potenciadores, y similares, que proporcionan de forma colectiva la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todos estos elementos de control necesitan estar siempre presentes siempre que la secuencia codificante seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula hospedadora apropiada.

La expresión "región promotora" se usa en este documento en su sentido habitual para hacer referencia a una región de nucleótidos que comprende una secuencia reguladora de ADN, donde la secuencia reguladora se obtiene de un gen que es capaz de unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección 3').

La expresión "unido de forma funcional" se refiere a una ordenación de elementos, donde los componentes así descritos están configurados para realizar su función habitual. Por tanto, elementos de control unidos de forma funcional a una secuencia codificante son capaces de lograr la expresión de la secuencia codificante. Los elementos de control no tienen que estar contiguos con la secuencia codificantes, siempre que funcionen dirigiendo la expresión de la misma. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias transcritas aunque no traducidas entre una secuencia promotora y la secuencia codificantes y las secuencia promotora aún puede considerarse "unido de forma funcional" a la secuencia codificante.

Con el fin de describir la posición relativa de las secuencias de nucleótidos en una molécula particular de ácido nucleico durante toda la presente solicitud, tal como cuando se describe una secuencia particular de nucleótidos como situada "cadena arriba", "cadena abajo", "5'", o "3'" respecto a otra secuencia, debe entenderse que es la posición de las secuencias en la hebra no transcrita de una molécula de ADN que se menciona como convencional en la técnica.

El término "homología" se refiere al porcentaje de identidad entre dos restos polinucleotídicos o dos restos polipeptídicos. La correspondencia entre la secuencia de un resto con otro puede determinarse por técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse homología por una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas polipeptídicas alineando la información de secuencia y usando programas

informáticos fácilmente disponibles. Como alternativa, puede determinarse homología por hibridación de polinucleótidos en condiciones, que forman dúplex estables entre regiones homólogas, seguida por digestión con una o más nucleasas específicas de una hebra, y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos ADN, o dos secuencias polipeptídicas son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando al menos aproximadamente el 80 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 90 %, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % de los nucleótidos a aminoácidos coinciden sobre una longitud definida de las moléculas, como se determina usando los métodos anteriores.

Por "aislado" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos, se entiende que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Por tanto, una "molécula de ácido nucleico aislada, que codifica un polipéptido particular", se refiere a una molécula de ácido nucleico, que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el presente polipéptido; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales, que no afectan de forma nociva a las características básicas de la composición.

Las expresiones "vector", "vector de clonación", "vector de expresión", y "vector auxiliar" significan el vehículo por el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen foráneo) en una célula hospedadora, para promover la expresión (por ejemplo, transcripción y/o traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, pseudovirus, etc. Como se usa en este documento con respecto a los vectores pseudoviricos, la expresión "vector de expresión" se usa muy habitualmente para hacer referencia a un vector que es capaz de infectar una célula hospedadora, mientras que la expresión "vector auxiliar" se usa para hacer referencia a un vector que es capaz de mediar el empaquetado apropiado del "vector de expresión" en una partícula tipo virus.

"Transferencia génica" o "suministro génico" se refiere a métodos o sistemas para insertar de forma fiable ADN foráneo en células hospedadoras.

Como se usa en este documento, se entiende que el término "transfección" incluye cualquier medio, tal como, aunque sin limitación, adsorción, microinyección, electroporación, lipofección y similares para introducir una molécula exógena de ácido nucleico en una célula hospedadora. El término "transfectada" o "transformada", cuando se usa para describir una célula, significa una célula que contiene una molécula de ácido nucleico introducida de forma exógena y/o una célula cuya composición genética se ha alterado mediante la introducción de una molécula exógena de ácido nucleico.

Como se usa en este documento, el término "tumor" se refiere a un tejido que comprende células transformadas que crecen de forma incontrolable. Un tumor puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Los tumores incluyen, leucemia, linfomas, mielomas, plasmacitomas, y similares; y tumores sólidos. Ejemplos de tumores sólidos que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen sarcomas y carcinomas tales como, aunque sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesiotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de células escamosas, carcinoma de células basales, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, neuroglioma, y retinoblastoma.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte del modo en que se mide o determina el valor, por ejemplo, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviaciones típicas, según la práctica en la técnica. Como alternativa "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferiblemente hasta el 10 %, más preferiblemente hasta el 5 %, y más preferiblemente hasta el 1 % de un valor dado. Como alternativa, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente en 5 veces, y más preferiblemente en 2 veces de un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, debe asumirse que, salvo que se indique de otro modo, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en este documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones de vehículo, suspensiones, coloides, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que sea compatible cualquier medio o agente convencional con el ingrediente activo, se contempla su uso en las

composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administra a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien comprendida en la técnica. Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de inyección.

Como se usa en este documento, la expresión "secuencia o gen heterólogo" significa una secuencia de ácido nucleico (ARN o ADN), que no se encuentra de forma natural en asociación con las secuencias de ácido nucleico de la molécula especificada, por ejemplo, un genoma de papilomavirus. La siguiente sección proporciona mayor detalle sobre algunos enfoques que pueden usarse para preparar partículas tipo virus y pseudovirus.

Preparación de partículas tipo virus y pseudovirus

La expresión "partícula tipo virus" ("VLP") se refiere a una estructura organizada que comprende series ordenadas de autoensamblaje de una o más proteínas de cápsida vírica que no incluyen un genoma vírico. Por ejemplo, pueden prepararse VLP que tienen la proteína de cápsida L1 de papilomavirus solamente, o que tienen ambas proteínas de cápsida L1 y L2 juntas. Los métodos usados para preparar partículas de cápsida recombinantes para muchos papilomavirus son conocidos en la técnica. Algunos enfoques se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2006/0269954.

La expresión "proteína recombinante" se refiere a una proteína que se produce usando técnicas de biología molecular, por ejemplo, tecnología de ADN recombinante. Como un ejemplo, "proteína recombinante" puede referirse a una proteína procedente de un ácido nucleico modificado por ingeniería genética, tal como una "construcción de ácido nucleico recombinante". Cualquier proteína, péptido, o polipéptido puede estar codificado por una construcción de ácido nucleico modificada por ingeniería o construcción de ácido nucleico recombinante. La expresión "expresión proteica" se refiere a los procesos de transcripción y traducción de ácidos nucleicos para producir polipéptidos.

"Pseudovirus" o "pseudovirus de papiloma" o "vectores de transferencia génica de papilomavirus" se refieren a una o más proteínas de cápsida de papilomavirus que se ensamblan y empaquetan ácidos nucleicos heterólogos (por ejemplo, ADN) con o sin ácidos nucleicos víricos (por ejemplo, ADN) en partículas infecciosas. Los métodos usados para producir pseudovirus de papiloma son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 6.599.739, 7.205.126, y 6.416.945; y en Buck y Thomson, Production of Papillomavirus-Based Gene Transfer Vectors. Current Protocols in Cell Biology 26.1.1-26.1.19, diciembre de 2007.

La expresión "estructura capsomérica" o "cápsida" o "partícula de cápsida" incluye VLP y pseudovirus. La siguiente sección describe algunas de las realizaciones de diagnóstico contempladas.

Diagnósticos

Algunas realizaciones descritas en este documento se refieren a métodos para detectar la presencia de células cancerosas unidas a pseudovirus de papiloma o VLP de papiloma. Algunos enfoques implican identificar un sujeto que tiene o sospechoso de tener células cancerosas, administrar al sujeto una cantidad detectable de un pseudovirus o VLP de papiloma que comprende un marcador detectable, y detectar la presencia de células cancerosas unidas a un pseudovirus o VLP de papiloma que comprende un marcador detectable.

Otras realizaciones descritas en este documento se refieren a métodos para detectar la presencia de afecciones premalignas (por ejemplo, displasia, o enfermedad hiperproliferativa). Algunos enfoques implican identificar un sujeto que tiene o sospechoso de tener una afección premaligna, administrar al sujeto una cantidad detectable de un pseudovirus o VLP de papiloma que comprende un marcador detectable y detectar la presencia de células premalignas unidas a un pseudovirus o VLP de papiloma que comprende un marcador detectable.

Realizaciones descritas en este documento se refieren a métodos para identificar todos los tipos de cánceres, tumores, metástasis, y afecciones premalignas (por ejemplo, displasia o enfermedad hiperproliferativa). Aunque sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se cree que el pseudovirus o VLP de papiloma se une selectivamente a y suministra el marcador a células cancerosas sin unirse a células normales en tejidos intactos, donde la cantidad de células normales en tejidos intactos unidas al pseudovirus o VLP es de menos o igual al 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, o 0,01 % de la cantidad total de células unidas por el pseudovirus o VLP.

El marcador detectable puede ser un gen indicador portado dentro del pseudovirus de papiloma o un marcador acoplado químicamente a una proteína de cápsida del pseudovirus o VLP de papiloma.

Genes indicadores

Como los vectores pseudoviricos de papiloma son vectores de transferencia génica, se contempla que las células cancerosas puedan marcarse selectivamente con genes indicadores que están incorporados en el pseudovirus. Como se usa en este documento un "indicador" o un "gen indicador" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transcribirse como ARNm cuando está unida de forma funcional a un promotor, excepto que la expresión "gen indicador" como se usa en este documento, no pretende incluir secuencias de papilomavirus de tipo silvestre. Genes indicadores preferidos incluyen luciferasa (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga o luciferasa de Renilla), βgalactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), timidina quinasa (TK), y proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína verde fluorescente, proteína roja fluorescente, proteína amarilla fluorescente, proteína azul fluorescente, proteína cian fluorescente, o variantes de las mismas, incluyendo variantes potenciadas).

Estos genes pueden incorporarse en pseudovirus de papiloma usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia. Se describen métodos adecuados, por ejemplo, en Buck y Thomson, Production of Papillomavirus-Based Gene Transfer Vectors. *Current Protocols in Cell Biology* 26.1.1-26.1.19, diciembre de 2007, que se incorpora expresamente por la presente por referencia en su totalidad.

Cualquier secuencia de ácido nucleico indicadora puede usarse como gen indicador si es detectable por un ensayo indicador. Los ensayos indicadores incluyen cualquier método conocido para detectar una secuencia de ácido nucleico o su producto proteico codificado directa o indirectamente. Pueden realizarse ensayos indicadores *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, un ensayo indicador puede medir el nivel de expresión o actividad del gen indicador midiendo el nivel de ARNm indicador, el nivel de proteína indicadora, o la cantidad de actividad de proteína indicadora. El nivel de ARNm indicador puede medirse, por ejemplo, usando RT-PCR, tinción con bromuro de etidio de un gel convencional de ARN, transferencia de Northern, extensión de cebador, o ensayo de protección con nucleasa. El nivel de proteína indicadora puede medirse, por ejemplo, usando quimioluminiscencia, análisis microscópico, tinción con Coomassie de un gel de SDS-PAGE, transferencia de Western, transferencia dot blot, transferencia slot blot, ELISA, o RIA. La actividad de proteína indicadora puede medirse usando un ensayo específico para el indicador que se está usando. Por ejemplo, ensayos convencionales para luciferasa, CAT, βgalactosidasa, ensayos de timidina quinasa (TK) (incluyendo escáneres del cuerpo completo; véase Yu, Y. et al. (2000) *Nature Medicine* 6:933-937 and Blasberg, R. (2002) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22:1157-1164), y proteínas fluorescentes son todos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un dispositivo de imágenes Maestro (CRi, Woburn, MA) para detectar la expresión de gen indicador.

La presencia del marcador puede detectarse en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica para exploración *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marcador usado, los expertos en la materia son capaces de determinar el método apropiado para detectar un marcador particular. Métodos y dispositivos que pueden usarse en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen, aunque sin limitación, tomografía computerizada (CT), escáner de cuerpo completo tal como tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotones individuales (SPECT), imágenes por resonancia magnética (MRI), sonografía, quimioluminiscencia, y el sistema de imágenes *in vivo* Maestro™ (CRi, Inc.). La exploración *in vivo* puede realizarse en una región local del sujeto (por ejemplo, puede explorarse el área esofágica) o puede realizarse escáner del cuerpo completo.

Las células cancerosas que expresan los marcadores genéticos suministrados por pseudovirus pueden identificarse del siguiente modo: para el gen HSV-tk, puede suministrarse al sujeto 9-[(4¹⁸F]fluoro-3-hidroximetilbutil)guanina radiomarcada (FHBG), administrada por vía intravenosa, aproximadamente 6000 μCi/Kg de peso corporal del destinatario (disponible en el mercado de PET Imaging Science Center, U. of South California). La expresión de la actividad HSV-tk en células cancerosas provoca la acumulación de FHBG radiomarcada y puede controlarse por tomografía de emisión de positrones (PET). Las células cancerosas que expresan GFP en *in vitro* pueden controlarse por examen microscópico de fluorescencia de secciones tisulares. Las secciones tisulares de células cancerosas que expresan Fluc o Rluc pueden controlarse por cámaras por dispositivos refrigerados de carga acoplada (CCD) *in vivo* (disponibles en el mercado en Xenogen Corp., Alameda, Calif). La actividad D₂R puede identificarse administrando 3-(2-[¹⁸F]fluoroetil)espiperona ([¹⁸F]FESP) y controlarse por PET. La siguiente sección describe ejemplos de marcadores que pueden acoplarse químicamente a pseudovirus o VLP y ejemplos de métodos que pueden usarse para acoplar químicamente marcadores a pseudovirus o VLP.

Marcadores acoplados químicamente

Algunas realizaciones también se refieren a métodos de identificación de cánceres, tumores, metástasis y afecciones premalignas usando pseudovirus o VLP de papiloma marcados mediante acoplamiento químico. Los marcadores acoplados químicamente incluyen, aunque sin limitación, colorantes fluorescentes, fósforos, radionúclidos, y otras moléculas conocidas en la técnica que pueden detectarse directa o indirectamente.

Ejemplos de colorantes fluorescentes incluyen, aunque sin limitación, 7-amino-actinomicina D, naranja de acridina, amarillo de acridina, colorantes Alexa Fluor (Molecular Probes), auramina O, tinte auramina-rodamina, benzantrona, 9,10-bis(feniletinil)antraceno, 5,12-bis(feniletinil)naftaceno, CFDA-SE, CFSE, calceína, carboxifluoresceína, 1-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno, 2-cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno, cumarina, cianina, DAPI, Dark quencher, Dioc6,

5 colorantes DyLight Fluor (Thermo Fisher Scientific), bromuro de etidio, fluoresceína, fura-2, fura-2-acetoximetil éster, proteína fluorescente verde y derivados, colorantes Hilyte Fluor (AnaSpec), tinte Hoechst, amarillo Indian, luciferina, perileno, ficobilina, ficoeritrina, ficoeritrobilina, yoduro de propidio, piranina, rodamina, RiboGreen, rubreno, tris(batofenantrolina disulfonato) de rutenio (II)), SYBR Green, estilbeno, sulforrodamina 101, TSQ, Texas Red, umbeliferona, o proteína amarilla fluorescente.

10 Ejemplos de fósforos incluyen, aunque sin limitación, fósforo, antraceno, fluoruro de bario, germanato de bismuto, sulfuro de cadmio, tungstato de cadmio, oxisulfuro de gadolinio, bromuro de lantano, poliviniltolueno, scheelita, yoduro de sodio, estilbeno, aluminato de estroncio, granate de aluminio e itrio, selenuro de zinc, o sulfuro de zinc.

15 Ejemplos de marcadores radioisotópicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, ^3H , ^{251}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{186}Re , ^{188}Re , o ^{212}Bi . Pseudovirus o VLP radiomarcados preferibles son capaces de suministrar más de 6000 rads al tumor y tienen suficiente afinidad de modo que la médula ósea del paciente no se expone a más de 300 rads. En algunas realizaciones, 100, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, o 10000 rads a las células cancerosas. Por ejemplo, ^{131}I marcado acoplado a la superficie de pseudovirus o VLP es un ejemplo de un pseudovirus o VLP radiomarcado dentro del alcance de estas realizaciones. El uso de pseudovirus o VLP marcados con ^{131}I así como otros pseudovirus o VLP radiomarcados, también está dentro del alcance de estas realizaciones. Los pseudovirus o VLP pueden radiomarcarse, por ejemplo, mediante el método de yodogén de acuerdo con métodos establecidos.

20 La detección puede suceder *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, pueden acoplarse colorantes fluorescentes (por ejemplo, Alexa Fluor 488) al pseudovirus por métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Buck y Thomspson, Production of Papillomavirus-Based Gene Transfer Vectors. Current Protocols in Cell Biology 26.1.1-26.1.19, diciembre de 2007).

25 En algunas realizaciones, se acopla químicamente un compuesto de imágenes radiactivas a los pseudovirus o VLP. Pueden acoplarse rastreadores químicos radiactivos que emiten radiación tales como rayos gamma a los pseudovirus o VLP para proporcionar información de diagnóstico. En el caso de capas forradas de óxido de itrio, puede añadirse un emisor de positrones tal como ^{87}Y para permitir la formación de imágenes. En el caso de fosfato de lantano, existen diversos emisores gamma que pueden usarse para añadir un componente de imágenes al componente de tratamiento.

30 Un marcador puede acoplarse químicamente directamente al pseudovirus o VLP (por ejemplo, sin un grupo enlazador) a través de un grupo amino, un grupo sulfhidrido, un grupo hidroxilo, o un grupo carboxilo.

35 En algunas realizaciones, se fija un marcador al pseudovirus o VLP mediante un grupo enlazador. El grupo enlazador puede ser cualquier grupo enlazador biocompatible, donde "biocompatible" indica que el compuesto o grupo puede ser no tóxico y puede utilizarse *in vitro* o *in vivo* sin causar lesión, dolencia, enfermedad, o muerte. El marcador puede unirse al grupo enlazador, por ejemplo, mediante un enlace éter, un enlace éster, un enlace tiol o un enlace amida. Grupos enlazadores biocompatibles adecuados incluyen, aunque sin limitación, un grupo éster, un grupo amida, un grupo imida, un grupo carbamato, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un carbohidrato, un grupo succinimida (incluyendo, por ejemplo, succinimidil succinato (SS), succinimidil propionato (SPA), succinimidil butanoato (SBA), succinimidil carboximetilato (SCM), succinimidil succinamida (SSA) o N-hidroxil succinimida (NHS)), un grupo epóxido, un grupo oxicarbonilimidazol (incluyendo, por ejemplo, carbonildimidazol (CDI)), un grupo nitrofenilo (incluyendo, por ejemplo, nitrofenil carbonato (NPC) o triclorofenil carbonato (TPC)), un grupo trisilato, un grupo aldehído, un grupo isocianato, un grupo vinilsulfona, un grupo tirosina, un grupo cisteína, un grupo histidina o una amina primaria.

40 Los marcadores acoplados químicamente pueden detectarse usando cualquiera de los métodos descritos para detectar genes indicadores. En una realización, el pseudovirus o VLP de papiloma se marca con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a radiación (Thurston et al., patente de Estados Unidos n.º 5.441.050). En otra realización, el pseudovirus o VLP de papiloma se marca con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de exploración sensible a fluorescencia. En otra realización, el pseudovirus o VLP de papiloma se marca con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía de emisión de positrones. En otra realización más, el pseudovirus o VLP de papiloma se marca con un marcador paramagnético y se detecta en un paciente usando imágenes de resonancia magnética (MRI). La siguiente sección proporciona mayor detalle sobre algunas realizaciones que pueden usarse para controlar la terapia contra el cáncer.

60 Control de la terapia contra el cáncer

65 La expresión "control de la terapia contra el cáncer" se refiere a determinar la cantidad relativa de células cancerosas en el cuerpo de un paciente antes, durante y/o después de terapia antineoplásica.

Algunas realizaciones descritas en este documento se refieren a métodos para controlar el progreso o eficacia de la terapia contra el cáncer en un sujeto. A sujetos identificados como que tienen cáncer y están experimentando terapia contra el cáncer se les puede administrar pseudovirus o VLP de papiloma que incluyen marcadores descritos anteriormente.

5 Puede administrarse a los sujetos un pseudovirus o VLP de papiloma que incluye un marcador antes del inicio del tratamiento o durante el tratamiento. Pueden ensayarse las células que contienen el marcador y esta medición puede compararse con una obtenida en un momento posterior durante la terapia y/o después de que se haya completado la terapia. De este modo, es posible evaluar la inhibición de la proliferación de las células cancerosas, y la eficacia de la terapia. Como solamente las células cancerosas vivas contendrán el marcador, la terapia puede continuar hasta que se detecte una cantidad mínima de marcador.

15 Algunas realizaciones descritas en este documento también se refieren a métodos para determinar la cantidad de células cancerosas presentes en un sujeto. Detectando el marcador, se puede determinar si hay células cancerosas presentes en el sujeto y la cantidad de marcador medida proporcional a la cantidad de células cancerosas presentes en el sujeto.

Kits de diagnóstico y terapéuticos

20 Algunas realizaciones incluyen métodos que utilizan los pseudovirus o VLP en kits para la detección y/o tratamiento de tumores. Los kits se basan en la especificidad potenciada del pseudovirus o VLP hacia células cancerosas en lugar de células no cancerosas.

25 Los kits de diagnóstico pueden comprender una cantidad eficaz de un pseudovirus o VLP de papiloma marcado. Los kits pueden comprender adicionalmente una cantidad apropiada de células de control no cancerosas. El pseudovirus, VLP y/o células pueden suministrarse congelados, liofilizados o cultivados en medio sólido o líquido. Los kits de diagnóstico pueden comprender adicionalmente ingredientes inertes y otros componentes del kit tales como viales, aplicadores, componentes de embalaje y similares, que son conocidos para los expertos en la materia.

30 En una realización, puede ensamblarse un kit para la detección de diagnóstico de cáncer cervical. El kit puede incluir un pseudovirus o VLP de papiloma que incluye un marcador (por ejemplo, un marcador fluorescente). El pseudovirus o VLP puede estar presente en el kit en un medio líquido que puede aspirarse sobre la mucosa cervicovaginal de un sujeto. Después de un periodo de incubación para permitir que el pseudovirus o VLP se fije selectivamente a las células cancerosas sospechosas, puede lavarse la mucosa cervicovaginal para retirar el exceso de pseudovirus o VLP no unido. Posteriormente, puede usarse un dispositivo de detección (por ejemplo, un dispositivo de detección fluorescente) para detectar y/o medir el marcador incluido en el pseudovirus o VLP. La detección del marcador indicará la presencia de células cancerosas.

Aplicaciones biomédicas

40 Realizaciones descritas en este documento también se refieren a métodos de inhibición selectiva de la proliferación de células cancerosas (o células pre-malignas) y/o eliminación de células cancerosas (o células pre-malignas) sin inhibir la proliferación de y/o eliminación de células normales. En algunos enfoques, se identifica a un sujeto que tiene cáncer usando técnicas clínicas o de diagnóstico conocidas en la técnica. Al sujeto después se le proporciona una cantidad inhibidora de pseudovirus o VLP de papiloma que incluye un agente terapéutico. Como el pseudovirus o VLP de papiloma se fija selectivamente a células cancerosas, puede proporcionarse una terapia muy centrada y sensible contra el cáncer. En algunas realizaciones, puede tratarse una afección pre-maligna usando métodos descritos en este documento.

50 En algunos contextos, la expresión "inhibición selectiva" o "inhibición específica" indica que la cantidad de células normales que muestran una inhibición de la proliferación o se eliminan es de menos de o igual al 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,001 %, 0,0001 %, 0,00001 %, o 0 % de la cantidad total de células que se ha puesto en contacto con el pseudovirus o VLP de papiloma o en un sitio de inoculación (por ejemplo, un sitio de 1 cm², 1 mm², 1 μm², o 1 nm²). Una determinación de inhibición específica, unión específica, o inhibición selectiva o unión selectiva de pseudovirus o VLP a células cancerosas o células pre-malignas puede determinarse por un intervalo de métodos conocidos en la técnica o como se describe en este documento (por ejemplo, ensayos de unión competitiva o análisis de Scatchard). En algunos contextos, la unión específica, inhibición específica, o unión selectiva o inhibición selectiva puede determinarse por mera observación, como se muestra en el Ejemplo 11.

Genes terapéuticos

65 Los genes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, genes terapéuticos, proteínas codificadas por genes terapéuticos, citotoxinas, y radionúclidos. Los genes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, genes supresores tumorales, genes pro-apoptóticos, citoquinas, enzimas, hormonas, y genes inmunomoduladores.

Un "gen terapéutico" se refiere a un gen que puede administrarse a un sujeto con el fin de tratar o prevenir una enfermedad. Por ejemplo, un gen terapéutico puede ser un gen administrado a un sujeto para el tratamiento del cáncer. Ejemplos de genes terapéuticos incluyen, aunque sin limitación, Rb, CFTR, p16, p21, p27, p57, p73, C-CAM, APC, CTS-1, zac1, scFV ras, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-1, MEN-II, BRCA1, VHL, MMAC1, FCC, MCC, BRCA2, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 IL-12, GM-CSF, G-CSF, timidina quinasa, mda7, fus, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, ADP, p53, ABL1, BLC1, BLC6, CBFA1, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOX, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3, YES, MADH4, RBI, TP53, WT1, TNF, BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, ApoAI, ApoAIV, ApoE, Rap1A, citosina desaminasa, Fab, ScFv, BRCA2, zac1, ATM, HIC-1, DPC- 4, FHIT, PTEN, ING1, NOEY1, NOEY2, OVCA1, MADR2, 53BP2, IRF-1, Rb, zac1, DBCCR-1, rks-3, COX-1, TFPI, PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf, erb, fms, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF, o MCC.

En ciertas realizaciones, el gen terapéutico puede ser un gen supresor tumoral. Un gen supresor tumoral se refiere a un gen, cuando está presente en una célula, reduce la tumorigenicidad, malignidad, o fenotipo hiperproliferativo de la célula. Esta definición incluye tanto la secuencia de ácido nucleico de longitud completa del gen supresor tumoral, así como secuencias de longitud no completa de cualquier longitud derivadas de las secuencias de longitud completa. Debe entenderse adicionalmente que la secuencia incluye los codones degenerados de la secuencia o secuencias nativas que pueden introducirse para proporcionar preferencia de codones en una célula hospedadora específica.

Ejemplos de ácidos nucleicos supresores tumorales dentro de esta definición incluyen, aunque sin limitación, APC, CYLD, HIN-1, KRAS2b, p16, p19, p21, p27, p27mt, p53, p57, p73, PTEN, Rb, Uteroglobina, Skp2, BRCA-1, BRCA-2, CHK2, CDKN2A, DCC, DPC4, MADR2/JV18, MEN1, MEN2, MTS1, NF1, NF2, VHL, WRN, WT1, CFTR, C-CAM, CTS-1, zac1, scFV, MAC1, FCC, MCC, Gen 26 (CACNA2D2), PL6, Beta* (BLU), Luca-1 (HYAL1), Luca-2 (HYAL2), 123F2 (RASSF1), 101F6, Gen 21 (NPRL2), o un gen que codifica un polipéptido SEM A3 y FUS1. Se describen otros genes supresores tumorales ejemplares en bases de datos disponibles al público de genes supresores tumorales. Ácidos nucleicos que codifican genes supresores tumorales, como se ha analizado anteriormente, incluyen genes supresores tumorales, o ácidos nucleicos derivados de los mismos (por ejemplo, ADNc, ARNc, ARNm, y subsecuencias de los mismos que codifican fragmentos activos de las secuencias respectivas de aminoácidos supresores tumorales), así como vectores que comprenden estas secuencias. Un experto en la materia estaría familiarizado con los genes supresores tumorales que pueden aplicarse en las realizaciones.

En ciertas realizaciones, el gen terapéutico puede ser un gen que induce apoptosis (es decir, un gen pro-apoptótico). Una "secuencia de aminoácidos de gen pro-apoptótico" se refiere a un polipéptido que, cuando está presente en una célula, induce o promueve la apoptosis. La presente invención contempla la inclusión de cualquier gen pro-apoptótico conocido para los expertos en la materia. Genes pro-apoptóticos ejemplares incluyen CD95, caspasa-3, Bax, Bag-1, CRADD, TSSC3, bax, hid, Bak, MKP-7, PERP, bad, bcl-2, MST1, bbc3, Sax, BIK, BID, y mda7. Un experto en la materia estaría familiarizado con los genes pro-apoptóticos, y otros de dichos genes no expuestos específicamente en este documento que pueden aplicarse en los métodos y composiciones de la presente invención.

El gen terapéutico también puede ser un gen que codifica una citoquina. El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Una "citoquina" se refiere a un polipéptido que, cuando está presente en una célula, mantiene alguna o toda la función de una citoquina. Esta definición incluye secuencias de longitud completa, así como no de longitud completa de cualquier longitud derivada de las secuencias de longitud completa. Debe entenderse adicionalmente, como se ha analizado anteriormente, que la secuencia incluye los codones degenerados de la secuencia o secuencias nativas que pueden introducirse para proporcionar preferencia de codones en una célula hospedadora específica.

Ejemplos de dichas citoquinas incluyen, aunque sin limitación, linfoquinas, monoquinas, factores de crecimiento y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas están las hormonas del crecimiento tales como hormona humana del crecimiento, hormona humana del crecimiento con N-metionilo, y hormona bovina del crecimiento; hormona paratiroides; tiroxina; insulina, proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoprotéicas tales como hormona foliculo estimulante (FSH), hormona estimulante de tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor-I y -II de crecimiento tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón-alfa, -beta, y -gamma; factores estimuladores de colonias (CS-Fs) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL- 3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10IL-11, IL-12; IL- 13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-24 LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, ligando-kit o FLT-3.

Otros ejemplos de genes terapéuticos incluyen genes que codifican enzimas. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, ACP desaturasa, una ACP hidroxilasa, una ADP-glucosa pirofosforilasa, una ATPasa, una alcohol deshidrogenasa, una amilasa, una amiloglucosidasa, una catalasa, una celulasa, una ciclooxigenasa, una decarboxilasa, una dextrinasa, una esterase, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una hialuron sintasa, una galactosidasa, una glucanasa, una glucosa oxidasa, una GTPasa, una helicasa, una hemicelulasa, una hialuronidasa, una integrasa, una invertasa, una isomerasa, una quinasa, una lactasa, una lipasa, una lipoxigenasa, una liase, una lisozima, una pectinesterasa, una peroxidasa, una fosfatasa, una fosfolipasa, una fosforilasa, una poligalacturonasa, una proteinasa, una peptidasa, una pulanasa, una recombinasa, una transcriptasa inversa, una topoisomerasa, una xilanas, un gen indicador, una interleuquina, o una citoquina.

Ejemplos adicionales de genes terapéuticos incluyen el gen que codifica la carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liase, arginasa, fumarilacetoacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, receptor de lipoproteína de baja densidad, porfobilinógeno desaminasa, factor VIII, factor IX, cistación beta-sintasa, cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa, albúmina, isovaleril-CoA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, piruvato carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, H-proteína, T-proteína, ATPasa transportadora de cobre de enfermedad de Menkes, ATPasa de transporte de cobre de enfermedad de Wilson, citosina desaminasa, hipoxantine-guanina fosforribosil-transferasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, fenilalanina hidroxilasa, glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, alfa-L-iduronidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, timidina quinase de HSV, o timidina quinase humana.

Genes terapéuticos también incluyen genes que codifican hormonas. Ejemplos incluyen, aunque sin limitación, genes que codifican la hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, hormona luteinizante, horma foliculo estimulante, gonadotropina coriónica, hormona estimulante de tiroides, leptina, adrenocorticotropina, angiotensina I, angiotensina II, beta-endorfina, hormona estimulante de beta-melanocitos, colecistoquinina, endotelina I, galanina, péptido inhibidor gástrico, glucagón, insulina, lipotropinas, neurofisinas, somatostatina, calcitonina, péptido relacionado con el gen de calcitonina, péptido relacionado con el gen de beta-calcitonina, factor de hipercalcemia de neoplasia, proteína relacionada con hormona paratiroides, proteína relacionada con hormona paratiroides, péptido tipo glucagón, pancreastatina, péptido pancreático, péptido YY, PHM, secretina, péptido intestinal vasoactivo, oxitocina, vasopresina, vasotocina, encefalinamida, metorfinamida, hormona estimuladora de alfa melanocitos, factor natriurético atrial, amilina, componente amiloide P, hormona liberadora de corticotropina, factor liberador de hormona del crecimiento, hormona liberadora de hormona luteinizante, neuropéptido Y, sustancia K, sustancia P, u hormona liberadora de tiotropina.

Un "ácido nucleico o gen inmunoestimulador" como se usa en este documento es cualquier ácido nucleico que contenga un motivo o estructura inmunoestimuladora que induzca una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede caracterizarse como, aunque sin limitación, una respuesta inmunitaria tipo Th1 o una respuesta inmunitaria tipo Th2. Dichas respuestas inmunitarias se definen por perfiles de citoquinas y producción de anticuerpos que se provocan por las células inmunitarias activadas.

Ejemplos de los genes inmunomoduladores incluyen quimioquinas, moléculas adhesivas, citoquinas, moléculas co-estimuladoras, factores del crecimiento, y moléculas receptoras. Las quimioquinas incluyen MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, IL-8 y MCP-1, Ejemplos de las moléculas adhesivas incluyen construcciones de la familia de selectina, moléculas tipo mucina, construcciones de la familia de integrina, y construcciones de la superfamilia de inmunoglobulina. Ejemplos de las construcciones de la familia de selectina incluyen L-selectina, P-selectina, y E-selectina. Las moléculas tipo mucina son ligandos para las construcciones de la familia de selectina. Ejemplos de la molécula tipo mucina incluyen CD34, GlyCAM-1, y MadCAM-1, Ejemplos de las construcciones de la familia de integrina incluyen LFA-1, VLA-1, Mac-1, y p150,95, Ejemplos de las construcciones de la superfamilia de inmunoglobulina incluyen PECAM-1, ICAM (ICAM-1, ICAM-2, y ICAM-3), CD2, y LFA-3, Ejemplos de las citoquinas incluyen mutantes de M-CSF, GM-CSF, G-CSF, CSF, IL-4, e IL-18 (incluyendo delección de los aproximadamente 35 primeros restos de aminoácido que están presentes en el precursor de una proteína pero no están presentes en la proteína en la forma madura). Ejemplos de moléculas co-estimuladoras incluyen B71, B72, CD40 y ligandos de CD40 (CD40L). Ejemplos factores del crecimiento incluyen IL-7, factores de crecimiento nervioso, y un factor de crecimiento del endotelio vascular. Ejemplos de las moléculas receptoras incluyen un producto de expresión génica letal Fas, un receptor del factor de necrosis tumoral TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, y DR6. Las composiciones de la presente invención pueden contener caspasa (ICE).

Los genes terapéuticos también incluyen genes que codifican polipéptidos que son citotóxicos para las células cancerosas. Las proteínas citotóxicas incluyen, aunque sin limitación, ricina, toxina de hierba carmín, toxina A diftérica, saporina, gelonina, y exotoxina A de pseudomonas.

Como entenderán los expertos en la materia, la expresión "gen terapéutico" incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc, y segmentos génicos modificados por ingeniería más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, y mutantes. La molécula de ácido nucleico que codifica un gen terapéutico puede comprender una secuencia contigua de ácido nucleico de

aproximadamente 5 a aproximadamente 12000 o más nucleótidos, nucleósidos, o pares de bases.

Agentes terapéuticos acoplados químicamente

5 Realizaciones descritas en este documento también se refieren a métodos de inhibición de la proliferación de cánceres, tumores y metástasis usando pseudovirus o VLP de papiloma acoplados químicamente a agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos acoplados químicamente incluyen, aunque sin limitación, proteínas terapéuticas como se ha descrito anteriormente, citotoxinas, y radionúclidos.

10 Las citotoxinas incluyen, aunque sin limitación, ricina, toxina de hierba carmín, toxina A diftérica, saporina, gelonina, y exotoxina A de pseudomonas.

15 En una realización, los pseudovirus o VLP de papiloma pueden acoplarse a una partícula de radionúclido. El pseudovirus o VLP puede fijarse a un sitio de unión en las células cancerosas diana, y el radionúclido puede administrarse a una dosis letal de radiación. La estrategia básica del tratamiento con radionúclidos es que el acoplamiento de un radionúclido al pseudovirus o VLP causa acumulación potenciada del radionúclido en el sitio diana. La acumulación del radionúclido en el sitio diana causa que se suministre radioterapia al sitio diana con un radio que se aproxima a la longitud media de paso de la partícula emitida.

20 Varios radionúclidos diferentes pueden considerarse para terapia. La elección del radionúclido tiene en cuenta las características físicas y químicas del radionúclido, incluyendo semivida, propiedades de emisión de radiación, propiedades de radiomarcaje, disponibilidad, distribución *in vivo* y estabilidad. Los radionúclidos adecuados poseen una semivida suficientemente larga para la localización de la diana, poca o ninguna radiación gamma, energía intermedia de partículas beta, productos hijo estables, y fijación estable con un sistema de anticuerpo. Están
25 disponibles muchos radionúclidos que emiten partículas-β. Estos incluyen, por ejemplo, itrio-90 (90Y), yodo-131 (131I), cobre-67 (67Cu) y renio-186 (186Re). Los radionúclidos que emiten partículas alfa (α) incluyen astatina-211 (211At), y bismuto-212 (212Bi). Los emisores alfa y beta son preferidos porque los enlaces de paso medio están limitados a docenas de mm, limitando de ese modo el tratamiento a las cercanías inmediatas de la diana. Las
30 partículas beta pueden ser más adecuadas para tumores más grandes debido a la longitud de paso medio más largo de la emisión beta. Las partículas alfa generalmente tienen energías extremadamente altas (mayores de 5 MeV) y tasas altas de transferencia de energía lineal, que son útiles para suministrar altas dosis a un área limitada.

35 Realizaciones adicionales descritas en este documento se refieren a combinaciones de métodos de diagnóstico y/o terapéutico descritos en este documento. Por ejemplo, pueden construirse pseudovirus que comprenden un gen terapéutico y un radionúclido. En otras realizaciones, pueden construirse pseudovirus que comprenden ARN oligo T y gen terapéutico.

Profármacos

40 El término "profármaco" como se usa en este documento se refiere a un fármaco que es inactivo según está y se vuelve activo cuando se cambia químicamente en el cuerpo por una enzima metabolizadora de fármacos (por ejemplo, derivados de purina y pirimidina usados como agentes quimioterapéuticos para el cáncer). Ejemplos de los
45 profármacos de este documento incluyen preferiblemente ganciclovir, aciclovir, taxol, camptotecina, derivados nucleosídicos de guanina (por ejemplo, A-5021), y similares. Un profármaco en este documento preferible para la presente invención es un profármaco que se convierte en una forma activa mediante un gen suicida contenido en un pseudovirus o VLP de papiloma.

50 La expresión "gen suicida" como se usa en este documento se refiere a un gen que puede eliminar la célula en que se expresa. De forma representativa, dicho gen es un gen metabólicamente tóxico. Por ejemplo, en este documento se ejemplifica un método para introducir un gen suicida incorporado en una construcción de pseudovirus o VLP en células cancerosas para dirigir las a suicidio. Por ejemplo, puede incorporarse timidina quinasa en un pseudovirus o VLP.

ARN oligo T para inducir regresión tumoral

55 Las vacunas terapéuticas antitumorales y terapia génica citotóxica antitumoral han producido éxito clínico limitado, a pesar de los esfuerzos extensivos. Un único enfoque que podría combinar las dos actividades podría conducir a terapia antitumoral más eficaz. Para conseguir esto, se construyó un vector de transferencia génica que expresa
60 ARN oligo T. En algunas realizaciones, el ARN se expresa a partir de un promotor, por ejemplo, un promotor de Pol III, como parte de un pseudogenoma de papilomavirus después de transducción de PsV. Este ARN no estará poliadenilado pero formará un dúplex con las colas poli A de los ARNm celulares. Los ARN bicatenarios así generados pueden conducir a citotoxicidad mediante la activación de apoptosis mediada por PKR e inmunidad a través de la activación de TLR 3. El pequeño tamaño y la función doble de este casete de expresión dejan abierta la
65 posibilidad de expresar otros genes en el pseudogenoma de hasta 8 kb. Podrían cotransducirse genes para aumentar la inmunogenicidad, tales como GMCSF, o citotoxicidad, tales como TK, mediante el PsV oligo T. Los PsV oligo T no pueden producirse de forma eficaz en la mayoría de las células ya que el oligo T se generaría en las

células productoras de PsV y por tanto inducirían apoptosis antes del ensamblaje de PsV. Sin embargo, líneas 293 y derivadas de 293, expresan ARN de VA de adenovirus, que interactúan con PKR y evita su activación por ARNbc. Puede producirse de forma eficaz PsV oligo T en una línea 293TT. Otras líneas celulares adecuadas incluyen aquellas que pueden expresar ARN de VA 1 y antígeno T largo de SV40 tales como células 293FT (Invitrogen). El pseudogenoma oligo T induce citotoxicidad después de introducción en líneas epiteliales que carecían de ARN de VA. El ácido nucleico oligo T puede ser de menos o de igual a 200, 175, 150, 125, 100, 95, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, o 10 nucleótidos.

Formulaciones

Realizaciones descritas en este documento también se refieren a métodos de administración de pseudovirus o VLP a un sujeto para poner en contacto células cancerosas con los pseudovirus o VLP. Las vías de administración pueden variar con la localización y naturaleza del tumor, e incluyen, por ejemplo, administración y formulación intravascular, intradérmica, transdérmica, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, regional, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intraarterial, intravesical, intratumoral, por inhalación, por perfusión, por lavado, por inyección directa, y oral.

Se entiende que el término "intravascular" se refiere al suministro en la vasculatura de un paciente, que significa a, dentro, o en un vaso o vasos del paciente. En ciertas realizaciones, la administración puede ser a un vaso considerado una vena (intravenosa), mientras que en otras administraciones puede ser a un vaso considerado una arteria. Las venas incluyen, aunque sin limitación, la vena yugular interna, una vena periférica, una vena coronaria, una vena hepática, la vena porta, la vena safena grande, la vena pulmonar, la vena cava superior, la vena cava inferior, una vena gástrica, una vena esplénica, una vena mesentérica inferior, una vena mesentérica superior, vena cefálica, y/o vena femoral. Las arterias incluyen, aunque sin limitación, la arteria coronaria, arteria pulmonar, arteria braquial, arteria carótida interna, arteria aórtica, arteria femoral, arteria periférica, y/o arteria ciliar. Se contempla que el suministro puede ser a través o a una arteriola o capilar.

La inyección a la vasculatura tumoral se contempla específicamente para tumores concretos, sólidos, accesibles. La administración local, regional o sistémica también puede ser apropiada. Para tumores de más de aproximadamente 4 cm, el volumen a administrarse puede ser de 4-10 ml (preferiblemente 10 ml), mientras que para tumores de menos de aproximadamente 4 cm, puede usarse un volumen de aproximadamente 1-3 ml (preferiblemente 3 ml). Múltiples inyecciones suministradas como una única dosis comprenden volúmenes de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml. Los pseudovirus o VLP pueden ponerse en contacto de forma ventajosa administrando múltiples inyecciones al tumor, espaciadas en intervalos de aproximadamente 1 cm.

En el caso de intervención quirúrgica, los pseudovirus o VLP pueden administrarse de forma preoperatoria, para volver a un tumor inoperable objeto de resección. Como alternativa, los pseudovirus o VLP pueden administrarse en el momento de la cirugía, y/o después de ello para tratar la enfermedad residual o metastásica. Por ejemplo, puede inyectarse o perfundirse un lecho tumoral resecaado con una formulación que comprende pseudovirus o VLP que vuelve al pseudovirus o VLP ventajoso para tratamiento de los tumores. La perfusión puede continuarse posresección, por ejemplo, dejando un catéter implantado en el sitio de la cirugía. Puede realizarse tratamiento periódico posquirúrgico.

También puede aplicarse administración continua cuando sea apropiado, por ejemplo, cuando se escinde un tumor y el lecho tumoral se trata para eliminar la enfermedad residual, microscópica. Dicha perfusión continua puede tener lugar durante un período de aproximadamente 1-2 horas, hasta aproximadamente 2-6 horas, hasta aproximadamente 6-12 horas, hasta aproximadamente 12-24 horas, hasta aproximadamente 1-2 días, hasta aproximadamente 1-2 semanas o más tiempo después del inicio del tratamiento. En líneas generales, la dosis de la composición terapéutica mediante perfusión continua será equivalente a la dada por una única inyección o múltiples inyecciones, ajustadas sobre un período de tiempo durante el cual sucede la perfusión.

Los regímenes de tratamiento pueden variar también, y a menudo dependen del tipo de tumor, la localización del tumor, la progresión de la enfermedad, y la salud y edad del paciente. Obviamente, ciertos tipos de tumor requerirán tratamiento más agresivo, mientras que al mismo tiempo, ciertos pacientes no pueden tolerar protocolos más impositivos. El médico será el más adecuado para tomar dichas decisiones basadas en la eficacia y toxicidad conocidas (si las hay) de las formulaciones terapéuticas.

En ciertas realizaciones, el tumor que se está tratando puede no ser, al menos inicialmente, resecaable. Los tratamientos con construcciones o VLP pseudovíricas terapéuticas pueden aumentar la resecaabilidad del tumor debido a encogimiento en los márgenes o por eliminación de ciertas partes particularmente invasivas. Después de los tratamientos, puede ser posibles la resección. Tratamientos adicionales posteriores a la resección pueden servir para eliminar enfermedad residual microscópica del sitio del tumor.

Un curso típico de tratamiento, para un tumor primario o un lecho tumoral posescisión, puede implicar múltiples dosis. El tratamiento principal típico para el tumor puede implicar una aplicación de 6 dosis sobre un período de dos semanas. El régimen de dos semanas puede repetirse una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más veces. Durante un

curso de tratamiento, puede reevaluarse la necesidad de completar las dosificaciones planeadas.

Los tratamientos pueden incluir diversas "dosis unitarias". Dosis unitarias se refiere a una dosis que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad a administrarse, y la vía particular y formulación, pertenecen a las habilidades de los expertos en las técnicas clínicas. Una dosis unitaria no tiene que administrarse como una inyección única, pero puede comprender infusión continua sobre un período establecido de tiempo. La dosis unitaria de la presente invención puede describirse convenientemente en términos de unidades formadoras de placa (pfu) para una construcción vírica. Las dosis unitarias varían de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} pfu y mayores. Como alternativa, dependiendo del tipo de pseudovirus y el título obtenible, se suministrarán de 1 a 100, 10 a 50, 100-1000, o hasta aproximadamente 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} o más partículas pseudovíricas infecciosas al paciente o a las células del paciente.

Composiciones y formulaciones inyectables

La inyección de pseudovirus o VLP puede suministrarse mediante jeringa a cualquier otro método usado para inyección de una solución, siempre que el pseudovirus o VLP pueda pasar a través del calibre particular de la aguja necesaria para la inyección. Recientemente se han descrito sistemas de inyección sin aguja novedosos (patente de Estados Unidos n.º 5.846.233) que tienen una boquilla que define una cámara de ampolla para alojar la solución y un dispositivo de energía para impulsar la solución desde la boquilla hasta el sitio de suministro. También se ha descrito un sistema de jeringa para su uso en terapia génica que permite múltiples inyecciones de cantidades predeterminadas de una solución de forma precisa a cualquier profundidad (patente de Estados Unidos n.º 5.846.225).

Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de Estados Unidos n.º 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe estar conservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si fuera necesario y el diluyente líquido primero se volvería isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para los expertos en la materia a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, puede disolverse una dosificación en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente sucederá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del paciente que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones deben de cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridas por las normas de la FDA Office of Biologies.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido por esterilización por filtración. En líneas generales, se preparan dispersiones incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

Las composiciones descritas en este documento pueden formularse en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la

proteína) y que se forman con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos sódico, potásico, de amonio, cálcico, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

5 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares.

10 Los siguientes ejemplos proporcionan ilustraciones de algunas de las realizaciones descritas en este documento pero no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1

15 *La transmisión genital de HPV en un modelo de ratón se potencia por Nonoxinol-9 y se inhibe por carragenina*

Se desarrolló un modelo de ratón de infección cervicovaginal con HPV16 que recapitula la fase de establecimiento de infección por papilomavirus del siguiente modo.

20 Se obtuvieron ratones BALB/cAnNCr hembra de seis a ocho semanas de edad del National Institutes of Health y se alojaron y manipularon de acuerdo con sus directrices. Se aprobaron protocolos experimentales por el National Cancer Institute's Animal Care and Use Committee. Salvo que se indique de otro modo, todos los ratones recibieron 3 mg de Depo-Provera (Pfizer) diluido en 100 μ l de PBS estéril en una inyección subcutánea 4 días antes de la exposición al pseudovirus.

25 Para exposición vaginal, los ratones designados para pretratamiento con N-9 recibieron 50 μ l del compuesto que contenía N-9 de forma intravaginal 6 h antes de la inoculación intravaginal con pseudovirus. El material se suministró con una pipeta de desplazamiento positivo M50 (Gilson), y se usaron fórceps convencionales de disección para ocluir la entrada vaginal para conseguir retención máxima del material. Los ratones designados para alteración mecánica experimentaron un procedimiento junto con inoculación del pseudovirus en que un colector celular Cytobrush (Cooper- Surgical) se insertó en la vagina y se giró en la dirección de las agujas del reloj y en dirección contraria a las agujas del reloj 10 veces. El inóculo de pseudovirus fue una dosis de 20 μ l compuesta de 5 μ l de pseudovirus purificado con un título de -5×10^9 IU/ml mezclado con 15 μ l de una preparación de carboximetilcelulosa (CMC) al 3 %, con la excepción de ciertos experimentos en que se mezclaron 5 μ l de inóculo con 5 μ l de la preparación indicada, o en que se mezclaron 15 μ l de inóculo con 5 μ l de CMC al 4 %. En los ratones pretratados con N-9, esta dosis se suministró como una inoculación intravaginal, atraumática en una vez usando una pipeta de desplazamiento positivo M20. En los ratones tratados con Cytobrush, el inóculo se suministró en dos dosis, 10 μ l antes y 10 μ l después del tratamiento con Cytobrush, usando una pipeta de desplazamiento positivo M20. Salvo que se indique de otro modo, el tracto reproductor se recogió en el día 3 posexposición después de sacrificar los ratones por inhalación de CO₂. Para exposición endocervical, se pretrató el canal endocervical por instilación directa de 15 μ l de CMC al 1 % o 15 μ l de CMC al 1 % con N-9 al 4 %. Seis horas después del pretratamiento, también se depositaron 7 μ l ($-1,4 \times 10^7$ IU) de pseudovirus mezclados con 7 μ l de CMC al 1% directamente en el canal endocervical.

45 Los resultados de estos ensayos iniciales mostraron que el modelo de ratón de infección cervicovaginal con HPV16 recapitulaba satisfactoriamente la fase de establecimiento de infección por papilomavirus. En el siguiente ejemplo, se evaluaron los efectos de nonoxinol-9 y carragenina en el modelo de ratón.

Ejemplo 2

50 *La transmisión genital de HPV en un modelo de ratón se potencia por nonoxinol-9 y se inhibe por carragenina*

Se investigó la capacidad de pseudovirus de infectar células dañadas mecánicamente, células tratadas con nonoxinol-9, y células tratadas con carragenina. Los detalles de estos experimentos están a continuación.

55 La abrasión mecánica suave del epitelio genital con un colector celular Cytobrush permitió niveles detectables de infección por pseudovirus. También se determinó si la alteración química del epitelio genital podría promover infección. N-9 es un tensioactivo no iónico activo de membrana que se usa ampliamente como espermicida y se sabe que altera la arquitectura normal del epitelio genital animal y humano. Se preparó una formulación de carboximetilcelulosa (CMC) al 3 % designada para imitar la viscosidad de un gel lubricante vaginal típico con o sin N-9 al 4 %. Los geles se instilaron en la vagina 6 h antes de que se inoculara a los ratones por vía intravaginal el pseudovirus. Los ratones pretratados con CMC solamente no estuvieron infectados de forma detectable, mientras que aquellos pretratados con Cytobrush o con CMC y N-9 eran muy susceptibles a infección ($P = 0,05, 0,003$, respectivamente) (Fig. 1a). De hecho, la intensidad de la señal indicadora en el último grupo fue un promedio de cinco veces más fuerte que la señal relacionada con infección inducida por tratamiento con Cytobrush ($P = 0,008$).

65 Conceptrol, un espermicida basado en CMC sin receta que contiene N-9 al 4 %, también sensibilizaba el tracto genital a infección por pseudovirus a un grado mayor que lo hacía el tratamiento con Cytobrush ($P = 0,02$).

Puede inhibirse potentemente *in vitro* una amplia gama de tipos de HPV genital por carragenina, un polisacárido barato cuyas propiedades gelificantes han conducido a su incorporación en algunos lubricantes vaginales sin receta. Para ensayar si el carragenina puede bloquear la infectividad *in vivo*, los ratones se expusieron a pseudovirus HPV16 premezclados 1:1 con t- carragenina al 1 % o una preparación de CMC al 3 % para controlar la viscosidad de la preparación de carragenina. El carragenina evitó la infección en la mucosa genital que se había vuelto susceptible a infección por alteración mecánica (Cytobrush) o alteración química (N-9) (Fig. 1b). Dos lubricantes comerciales que contienen carragenina (Divine n.º 9 y BIOglide) que mostraron fuerte actividad inhibidora en un ensayo *in vitro* de pseudovirus evitaron de forma similar la infección detectable *in vitro* (Fig. 1c). Para imitar más estrechamente las condiciones en que podría usarse carragenina en la práctica común como microbicida tópico para prevenir la transmisión de HPV genital, se aplicó por vía intravaginal N-9 en carragenina o N-9 en gel de CMC de control 6 h antes de la exposición a pseudovirus. Como se esperaba, el gel basado en CMC contenía N-9 que volvía a la mucosa susceptible a infección significativa por pseudovirus HPV ($P = 0,03$), mientras que el gel basado en carragenina evitaba la infección detectable (Fig. 1d). Cuando se compararon cada una de las condiciones de carragenina con los controles negativos, los valores P fueron $> 0,1$.

Los experimentos anteriores demuestran que la alteración mecánica permite infección por PsV, el tratamiento con N-9 potencia la infección, y el tratamiento con carragenina inhibe la infección. El siguiente ejemplo demuestra un método que puede usarse para acoplar un marcador a un pseudovirus.

20 Ejemplo 3

Acoplamiento de colorante Alexa Fluor 488 a pseudoviriones

El acoplamiento de colorante Alexa Fluor 488 a pseudoviriones HPV16-RFP se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para marcaje de proteínas (A10235, Molecular Probes). Se purificaron las cápsidas acopladas a colorante por filtración en gel sobre una columna de perlas de agarosa al 2 % de 50 a 150 μm (Agarose Bead Technologies). La retitulación de la preparación de pseudovirión conjugado con colorante confirmó que su infectividad permanecía comparable a la de pseudovirus no marcados.

El experimento anterior muestra que pueden acoplarse satisfactoriamente marcadores a pseudovirus y que la infectividad de los pseudovirus marcados es comparable con la de pseudovirus no marcados. El siguiente ejemplo a continuación demuestra una técnica para formación de imágenes de marcadores acoplados a o expresados en pseudovirus.

35 Ejemplo 4

Imágenes multiespectrales de fluorescencia y análisis estadístico

Para generar un ensayo más cuantitativo para infección cervicovaginal, se desarrolló un método para medir la expresión génica total del gen indicador en muestras de tejido completo usando un dispositivo de imágenes multiespectrales de fluorescencia. Para estos análisis, se evaluó la vagina y cuello del útero completos de ratón para la expresión del gen indicador, que generó datos sobre la distribución e intensidad de la infección y la intensidad media por pixel, permitiendo por tanto la comparación cuantitativa entre muestras (Fig. 2).

El tracto reproductor de cada ratón, desde los genitales externos hasta la mitad inferior de los cuernos uterinos, se escindió y almacenó en PBS en hielo durante <6 h antes de las imágenes. Se usó un dispositivo de imágenes maestro (CRi, Woburn, MA) con un filtro de excitación verde y un filtro de emisión de paso largo de 580 nm para obtener imágenes de 550 nm a 9,00 nm en incrementos de 10 nm de longitud de onda. Usando la firma espectral de RFP en tejidos infectados como señal y la autofluorescencia de fondo en tejidos no infectados como ruido, se aplicó un algoritmo sin mezcla espectral a las imágenes compuestas para determinar la intensidad y localización de la infección. El software de código abierto Image J, disponible online, se usó para calcular la señal media por pixel en una región de interés (ROI) en la representación de escala de grises de la señal no mezclada. La media de las cantidades así generadas representa el resultado de cada condición experimental particular. En algunos casos, para determinar si la diferencia entre estas medias era significativamente estadística, se realizó un ensayo-t de Student para muestras no relacionadas y los resultados se presentaron en el texto como un valor P .

Ratones tratados con Conceptrol se infectaron de forma simulada o se expusieron a pseudovirus HPV-16-tdTomato. Después de 3 días, se diseccionó el tracto reproductor completo y se hizo una incisión sagital en la pared ventral de la vagina y el cuello del útero. Se aplicó la imagen Composite Maestro con algoritmos sin mezcla. La señal roja representaba la localización de la infección en comparación con la autofluorescencia de fondo. La señal tdTomato no mezclada se convirtió a escala de grises. Análisis ImageJ. Se computó la señal media por pixel dentro de la ROI. Para ratones tratados de forma simulada, el área ROI fue de $3,3 \times 10^7$ y la señal media por pixel fue de 21,4. Para ratones expuestos a pseudovirus, el área ROI fue de $3,5 \times 10^7$ y la señal media por pixel fue de 1316,1.

Ejemplo 5

La mucosa cervicovaginal intacta es resistente a infección por HPV (métodos del Ejemplo de N-9/carragenina)

5 Se usó PsV con proteína fluorescente roja (RFP) para estudiar infección por papilomavirus del tracto genital de ratón. Sorprendentemente se descubrió que el tracto genital intacto era completamente resistente a infección después de deposición de 10^7 unidades infecciosas en la vagina o el canal endocervical. (Fig. 3) Incluso más sorprendentemente, el virus acoplado a colorante fluorescente verde no se unía a epitelio escamoso o simple que delimita el tracto reproductor femenino. (Fig. 4)

10

Ejemplo 6

Pseudovirus HPV no infecta tejido normal intacto

15 Se administraron de forma atraumática pseudoviriones HPV-16 que contenían el plásmido que expresa RFP (aproximadamente 10^8 unidades infecciosas de cultivos tisular) en las siguientes superficies de tejido: mucosa orofaríngea, lengua, intestino delgado, intestino grueso, canal anal, conjuntiva del ojo, tráquea, bronquios, peritoneo parietal, membrana serosa del tracto gastrointestinal, mesenterio del tracto gastrointestinal, hígado, bazo, vejiga, útero, ovarios, piel externa y parénquema pulmonar. La infección, evaluada por fluorescencia roja usando microscopía confocal, se observó solamente en el parénquema pulmonar. El siguiente ejemplo demuestra que los pseudovirus infectan de forma selectiva líneas de células cancerosas.

20

Ejemplo 7

25 *Pseudovirus HPV infectan muchas líneas celulares derivadas de tumor humano*

Se obtuvo un panel de 59 líneas de células tumorales humanas del National Cancer Institute's Developmental Therapeutics Program (DTP) In Vitro Cell Line Screening Project (IVCLSP), con el fin de ensayar la infectividad por pseudovirus HPV (Fig. 5 y 6). Se eligieron pseudoviriones HPV5 y HPV16 para la selección como representativos de HPV cutáneos y mucosotrópicos, respectivamente. los pseudovirus infecciosos purificados que contenían plásmidos indicadores de GFP se prepararon como se describe en Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller J.T. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. Methods Mol. Med. 119:445-462, 2005. Para HPV5, se usaron los plásmidos p5L1w, p5L2w y pfwb; y para HPV16, se usaron los plásmidos p16shell y pfwb. Se titularon los pseudovirus purificados en células 293TT como se describe en Buck et al. anteriormente, y se determinó el título de las reservas a $1,4 \times 10^9$ unidades infecciosas/ml para HPV16 y $2,2 \times 10^7$ unidades infecciosas/ml para HPV5.

30

35

Se inocularon las 59 líneas de células tumorales humanas del DTP en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos en 100 μ l a densidades de siembra que variaban de 5.000 a 40.000 células/pocillo dependiendo del tiempo de duplicación de las líneas celulares individuales.

40

Además, se inoculó HeLa, una línea celular de epitelio cervical humano (n.º catálogo CCL-2, ATCC, Manassas, VA 20108) del mismo modo que las líneas de células tumorales a 5.000 células por pocillo. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 5 % y L-glutamina 2 mM. Después de la inoculación de las células, las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %, aire al 95 % y humedad relativa del 100 % durante 24 horas antes de la adición del pseudovirus. Se hicieron tres diluciones en serie de factor diez de cada pseudovirus en DPBS + NaCl 0,8 M. Se añadieron 5 μ l de cada dilución, pseudovirus no diluido y DPBS + NaCl 0,8 M (fondo) en pocillos duplicados para cada línea celular. Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %, aire al 95 % y humedad relativa del 100 % durante 24 horas antes de la adición de 100 μ l por pocillo de medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 5 % y L-glutamina 2 mM. Las placas se incubaron durante otras 48 horas antes de análisis FACS (tiempo de infección total de 72 horas). Las células de cada pocillo se recogieron por separado y se sometieron a análisis FACS. Se determinó el porcentaje de células GFP positivas para cada muestra. Los valores obtenidos de muestras duplicadas se promediaron y se restó el fondo. La dilución de pseudovirus que producía del 1-10 % de células GFP positivas (en el intervalo lineal del análisis FACS) se usó para calcular los títulos de virus HPV5 y HPV16. Como se muestra en las Figuras 5 y 6, el panel de líneas de células tumorales será permisivo para infección por pseudovirus HPV5 y 16. Los experimentos anteriores indican que los pseudovirus de papiloma infectan específicamente líneas de células cancerosas. El siguiente ejemplo demuestra que los pseudovirus infectan selectivamente células tumorales *in vivo*.

45

50

55

Ejemplo 8

Pseudovirus HPV infectan de forma preferente células tumorales en un modelo de metástasis tumoral peritoneal

Se usó un modelo de tumor de cáncer de ovario murino establecido para ensayar la eficacia y especificidad de la infección por pseudovirus de implantes de nódulo de tumor peritoneal. Este modelo usa SHIN3-DSR1, que es una línea celular de cáncer de ovario humano transfectada de forma estable con un plásmido de proteína fluorescente

65

roja (RFP) de modo que RFP se expresa de forma constitutiva en la célula tumoral (Fig. 7). Se establecieron xenoinjertos de tumor intraperitoneal en ratones desnudos hembra 14 días después de inyección i.p. de 2×10^6 SHIN3-DSR en 200 μ l de PBS estéril. Tres días después de la inyección i.p. de 5×10^9 unidades infecciosas (IU) de HPV16-GFP en 300 μ l de PBS estéril, se sacrificaron los ratones y se analizaron las membranas peritoneales por imágenes multiespectrales de fluorescencia. La anatomía del tejido en imágenes y el sistema conceptual para las imágenes son similares a las encontradas en la Referencia 1, Fig. 4c. Específicamente, se seleccionó una parte de la membrana peritoneal del mesenterio intestinal de forma aleatoria y se propagó en una placa no fluorescente. Se obtuvieron dos imágenes compuestas diferentes con un dispositivo de imágenes Maestro. Para la primera, se usó un filtro de paso de banda de 445 a 490 nm y un filtro de paso largo sobre 515 nm para luz de emisión y excitación, respectivamente. El filtro ajustable en el Maestro se aumentó automáticamente en incrementos de 10 nm de 500 a 800 nm mientras la cámara capturaba imágenes en cada intervalo de longitud de onda con una exposición constante. Para la segunda, el filtro de paso banda y paso largo fueron de 503 a 555 y 580, respectivamente, y los incrementos de 10 nm de longitud de onda variaron de 500 a 800. Se aplicó un algoritmo sin mezcla espectral a la primera imagen para obtener una imagen no mezclada de GFP y de autofluorescencia. Se aplicó un algoritmo diferente a la segunda imagen para obtener una imagen no mezclada de RFP y de autofluorescencia. Estas dos imágenes finales se presentan, junto con la superposición, que demuestra un alto grado de co-localización de señal. Después de las imágenes multiespectrales, estos tejidos se congelaron instantáneamente, se seccionaron en un criotomo y se analizaron por microscopía confocal. Esto confirmó infección por HPV16-GFP mediante la demostración de la expresión de GFP en nódulos tumorales SHIN3-DSR que expresan RFP. Además, el análisis confocal mostró infección mínima, si la hubiera, de pseudovirus de membrana peritoneal normal adyacente. Este experimento indicó que el pseudovirus HPV16 infectaba de forma eficaz células de cáncer de ovario implantadas en la membrana peritoneal (Fig. 8). Mostró adicionalmente que la infección era muy específica para células tumorales, con superficies peritoneales normales libres de infección.

Se obtuvieron resultados similares en un modelo murino que usa SKOV3, una línea celular de cáncer de ovario humano, inyectada (Fig. 9). Justo como anteriormente, se establecieron xenoinjertos de tumor intraperitoneal en ratones desnudos hembra 14 días después de inyección i.p. de 1×10^5 células SKOV3. Tres días después de la inyección i.p. de 1×10^8 unidades infecciosas (IU) de HPV16 PsV-luciferasa o HPV16 PsV-RFP, los ratones se sacrificaron y se analizaron las membranas peritoneales por imágenes multiespectrales de fluorescencia como se ha analizado anteriormente.

HPV16-luciferasa

No se observó señal en ratones de control que carecían tanto de HPV16 PsV-luciferasa como de tumores, salvo cuando se añadía sustrato (d-luciferina 120 mg/kg i.p.). Además, no se observó señal en ratones de control que carecían de tumores, pero recibieron HPV16-luciferasa y sustrato. En ratones que poseían tumores, HPV16-luciferasa, y sustrato, se observó una señal significativa. (Fig. 10)

HPV16-RFP

No se observó señal en ratones de control a los que se inyectó HPV16 PsV-RFP pero carecían de tumores. En ratones que poseían tumores y recibieron HPV16 PsV-RFP, se observó fluorescencia significativa. (Fig. 11 y 12)

Estos experimentos confirmaron el hallazgo de que el pseudovirus HPV16 infectaba de forma eficaz células de cáncer de ovario implantadas en la membrana peritoneal. Se confirmó adicionalmente que la infección era muy específica para células tumorales, con superficies peritoneales normales libres de infección.

Ejemplo 9

Terapia génica de suicidio mediado por pseudovirus HPV de carcinoma de ovario

Basándose en el estudio general de línea celular derivada de tumor humano NCI-60, y a los resultados del experimento descrito anteriormente, se contempla que el suministro intraperitoneal de pseudovirus provocará infección eficaz y específica de las células de cáncer de ovario confinadas a la cavidad peritoneal, y que este método puede usarse para tratar cánceres de ovario. Mediante un enfoque, un método de terapia génica de suicidio, en que la transducción del gen para timidina quinasa (TK) de herpes simplex está seguida por tratamiento sistémico con el profármaco, ganciclovir. Tanto en el modelo de ratón desnudo SHIN3, como en el modelo de ratón inmunocompetente singénico MOSEC para cáncer de ovario, se contempla que las células de tumor intraperitoneal xenoinjertadas se transducirán de forma eficaz por pseudovirus HPV16-TK, y que las células tumorales que expresan TK convertirán el ganciclovir administrado de forma sistémica en su metabolito trifosfato tóxico, eliminando las células tumorales. Esto provocará una respuesta terapéutica, medida por carga tumoral disminuida y tiempo aumentado de supervivencia en ratones xenoinjertados. Como alternativa, se usará pseudovirus que expresa el oligo T para inducir regresión de las células tumorales. Además, basándose en los experimentos de la línea celular NCI-60, se contempla que explantes frescos de carcinomas de ovario humano serán permisivos a infección por pseudovirus. Este fenómeno se ilustra usando un protocolo similar a uno descrito previamente², en que se usa el sistema de cultivo tisular de corte fino de Krumdieck para preparar secciones delgadas de nódulos cancerosos

adecuados para análisis de transducción de virus *ex vivo*. (Véase, por ejemplo, 1. Hama, Y. et al. A target cell-specific activatable fluorescence probe for in vivo molecular imaging of cancer based on a self-quenched avidin-rhodamina conjugate. *Cancer Res* 67, 2791-9 (2007) y 2. Kirby, T.O. et al. A novel *ex vivo* model system for evaluation of conditionally replicative adenoviruses therapeutic efficacy and toxicity. *Clin Cancer Res* 10, 8697-703 (2004)).

Ejemplo 10

Pseudovirus HPTV que expresan oligo para citotoxicidad combinada e inmunidad a tumores

Se prepararon pseudovirus que expresan oligo T para proporcionar un enfoque simple para combinar vacunas terapéuticas antitumorales y terapia génica citotóxica antitumoral.

Construcción del plásmido pPolyT

Dos oligos

(GCGGCGTCTAGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT; SEQ ID NO: 1) y

GCGGCGTCTAGAAA; SEQ ID NO: 2) se hibridaron instantáneamente, después se extendieron con ADN polimerasa T4 (New England Biolabs). El ADN dúplex resultante se digirió con Xba I y se ligó en el sitio Xba I de una construcción de promotor pol-I/terminador murino, p417-Ron (obtenido de Ron A.M. Fouchier, Erasmus Medical Center, Países Bajos). Se secuenciaron los clones, y se seleccionó un clon con un tramo T de 45 pares de bases en la hebra con sentido.

Documentación experimental de citotoxicidad de pPolyT

Se transfectaron células HaCaT con pBluescript II KS+ (Stratagene) o pPolyT usando Lipofectamina LTX (Invitrogen). Después de 48 horas, se inspeccionaron las células por microscopia óptica y se trataron con un sustrato metabólico colorimétrico (WST-1, Roche). Las células que recibieron pPolyT mostraron morfología reticulada y eran bastante escasas respecto a células transfectadas con pBluescript (o no transfectadas). Se redujo la renovación de WST-1 en >2 veces en las células transfectadas con pPolyT.

Ejemplo 11

La administración intravenosa de pseudovirus HPV aborda metástasis pulmonares

De acuerdo con un protocolo establecido para producir metástasis de tumor pulmonar (véase, por ejemplo, Qian et al. Prophylactic, therapeutic and anti-metastatic effects of an HPV-16 mE6Δ/mE7/TBhsp70Δ fusion protein vaccine in an animal model. *Immunology Letters* 102(2):191-201 (2006)), se inyectó a una serie de ratones 2x10⁴ células TC-1 por vía intravenosa 2 semanas antes del experimento. Todos los ratones después se trataron con aproximadamente 1 x 10⁷ HPV16 PsV-luciferasa por vía intravenosa, incluyendo los animales de control, que recibieron solución salina en lugar de células tumorales. Posteriormente se midió la actividad luciferasa tras introducción del sustrato. No se detectó señal en los ratones de control. En los ratones que se habían inoculado con células tumorales, se detectó señal significativa, lo que indica que los pseudovirus abordan de forma eficaz metástasis pulmonares (Fig. 13). Este experimento demostró que la administración intravenosa de pseudovirus provoca abordaje específico de las células tumorales y escaso de tejido normal, similar al patrón demostrado después de administración por otras vías.

Ejemplo 12

Diagnóstico y tratamiento de cáncer cervical

A un sujeto que tiene cáncer cervical se le proporciona una composición que comprende una VLP de papiloma acoplada a un radionúclido (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C, ⁵¹Cr, ⁵⁷To, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ¹⁵²Eu, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ²¹¹At, ²¹²Pb, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁹Pd, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, o ²¹²Bi). La composición puede proporcionarse en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg. Como alternativa, la composición puede proporcionarse en una cantidad suficiente para suministrar 100, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, o 10000 rads a las células cancerosas. La composición puede proporcionarse en una aplicación vaginal conveniente y la composición puede estar en forma líquida o de gel. La composición que comprende la VLP de papiloma acoplada al radionúclido se proporciona al sujeto y se permite que las VLP marcadas se unan a las células de cáncer cervical durante 2, 4, 6, u 8 horas. Después de la unión, se retiran las VLP marcadas no unidas por lavado sucesivo. La cantidad de radiactividad presente en el canal vaginal se evalúa por determinaciones de dosimetría (por ejemplo, placas de dosimetría). Se proporciona una nueva placa diariamente durante 4 semanas y se recogen las placas al final de la evaluación y se observará en el tiempo una disminución gradual en la exposición radiactiva.

5 También se prevé que se tomará una biopsia cervical semanal para evaluar la reducción histológica de las células cancerosas durante el experimento. Los resultados mostraran que las VLP radiomarcadas se unen selectivamente a e identifican las células de cáncer cervical en el canal vaginal del sujeto y, con el tiempo, la radiactividad contribuirá a la reducción de la presencia y proliferación de las células cancerosas y la restauración de la morfología celular normal, en comparación con sujetos de control no tratados.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, THE Roberts, Jeff Lowy, Douglas R. Schiller, John T.

<120> PSEUDOVIRUS DE PAPILOMAVIRUS PARA DETECCIÓN Y TERAPIA DE TUMORES

15 <130> NIH360.001VPC

<150> 61/065.897
<151> 14-02-2008

20 <150> 60/928.498
<151> 08-05-2007

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210> 1
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador A Oligo T

<400> 1
gcggcgtcta gaatttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
59

35 <210>2
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador B Oligo T

45 <400> 2
gcggcgtcta gaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa
aaaaaaaaa aaaaaaaaa 59

REIVINDICACIONES

1. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma que comprenden un marcador detectable para su uso en un método de detección de la presencia de células cancerosas en un sujeto que tiene o es sospechoso de tener células cancerosas; en donde dicho método comprende:
- 5
- identificar un sujeto que tiene o es sospechoso de tener células cancerosas;
 - administrar a dicho sujeto una cantidad detectable de dicho pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma que comprenden un marcador detectable; y
 - 10 detectar la presencia de células cancerosas unidas a dicho pseudovirus de papiloma o dicha VLP de papiloma que comprenden un marcador detectable.
2. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha detección se realiza en un sujeto antes de un tratamiento de terapia contra el cáncer y durante o después de un periodo de dicho tratamiento.
- 15
3. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho marcador está acoplado químicamente a dicho pseudovirus o dicha VLP o dicho pseudovirus comprenden un gen que codifica dicho marcador.
- 20
4. Una composición que comprende un agente terapéutico formulado con un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso en un método de tratamiento del cáncer inhibiendo la proliferación de células cancerosas y/o eliminando células cancerosas sin inhibir la proliferación y/o sin eliminar las células normales en un sujeto identificado con un cáncer, en donde dicho agente terapéutico es citotóxico para una célula cancerosa.
- 25
5. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho agente terapéutico está acoplado químicamente a dicho pseudovirus o dicha VLP o se incorpora dentro de dicho virus o dicha VLP.
- 30
6. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en la que dicho agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en:
- a) un gen seleccionado del grupo que consiste en:
 - 35 i) un gen supresor tumoral;
 - ii) un gen pro-apoptótico;
 - iii) un gen que codifica una citoquina, una linfoquina, una monoquina, un factor de crecimiento, una enzima o una hormona;
 - iv) un gen inmunomodulador;
 - 40 v) un gen que codifica un polipéptido que es citotóxico para una célula cancerosa; y
 - vi) un gen suicida;
 - b) una citotoxina;
 - c) un radionúclido;
 - 45 d) un profármaco; y
 - e) un ácido nucleico terapéutico.
7. Una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en la que dicho agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ganciclovir o aciclovir, oligo T, y un ácido nucleico que expresa oligo T, en donde dicho ácido nucleico está unido de forma funcional a un promotor de Pol III.
- 50
8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho oligo T es de menos de o igual a 200, 175, 150, 125, 100, 95, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 nucleótidos.
- 55
9. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso en el método de detección de la presencia de células cancerosas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una composición para su uso en el método de tratamiento del cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, linfoma, mieloma, plasmacitoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabiomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico,
- 60
- 65

oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, neuroglioma y retinoblastoma.

- 5 10. Un kit que comprende un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma, un vehículo farmacéutico e instrucciones para el uso de los componentes del kit, en donde el pseudovirus o la VLP comprenden un agente terapéutico que es citotóxico para una célula cancerosa.
11. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma que comprenden un marcador detectable para su uso en un método de detección de la presencia de células de cáncer cervical en un sujeto, en donde dicho método comprende:
- 10 proporcionar a dicho sujeto una composición que comprende una VLP de papiloma acoplada a un marcador o que lo contiene;
retirar las VLP no unidas que comprenden dicho marcador; y
detectar la presencia de células cancerosas unidas a dicha VLP que comprende dicho marcador.
- 15 12. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicho marcador está acoplado químicamente a dicha VLP.
- 20 13. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 11 o 12, que comprende adicionalmente medir la presencia o la cantidad de dicho pseudovirus o dicha VLP unidos a dichas células cancerosas y la presencia o la cantidad de dicho pseudovirus o dicha VLP unidos a células normales.
- 25 14. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 11 o 12, en donde dicho marcador es fluorescente.
- 30 15. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 11 o 12, en donde dicho marcador es radiactivo.
16. Un pseudovirus de papiloma o una VLP de papiloma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 11 o 12, en donde dicho marcador es quimioluminiscente.

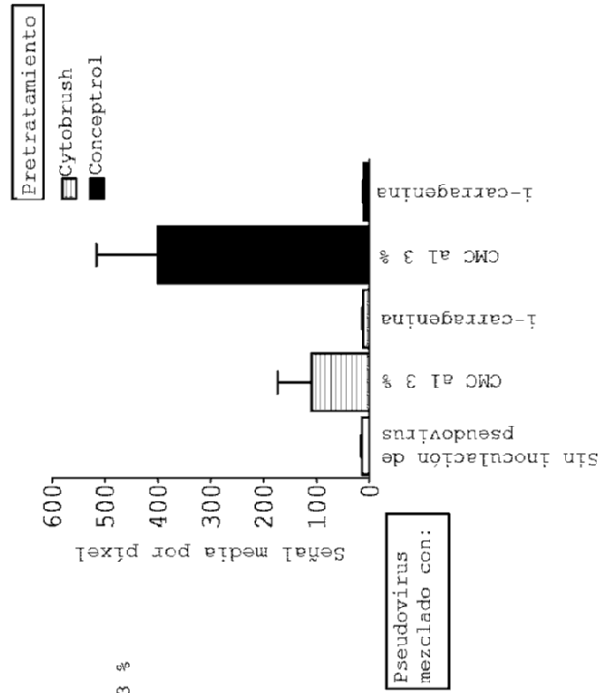


FIG. 1B

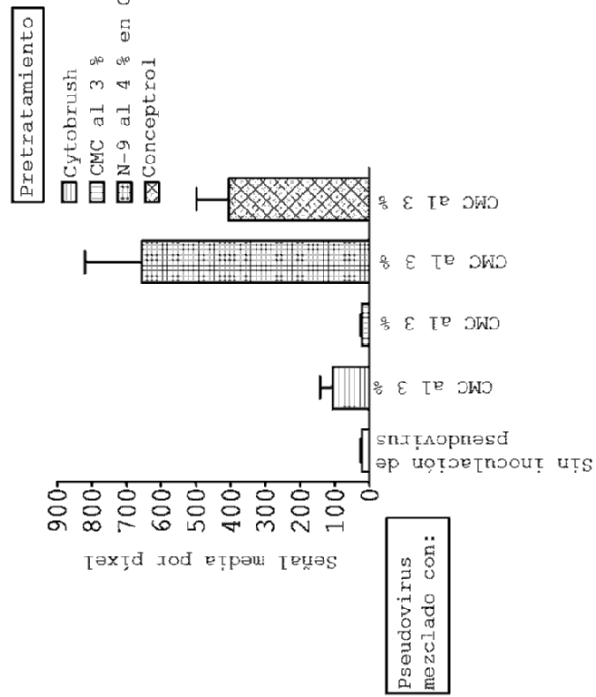


FIG. 1A

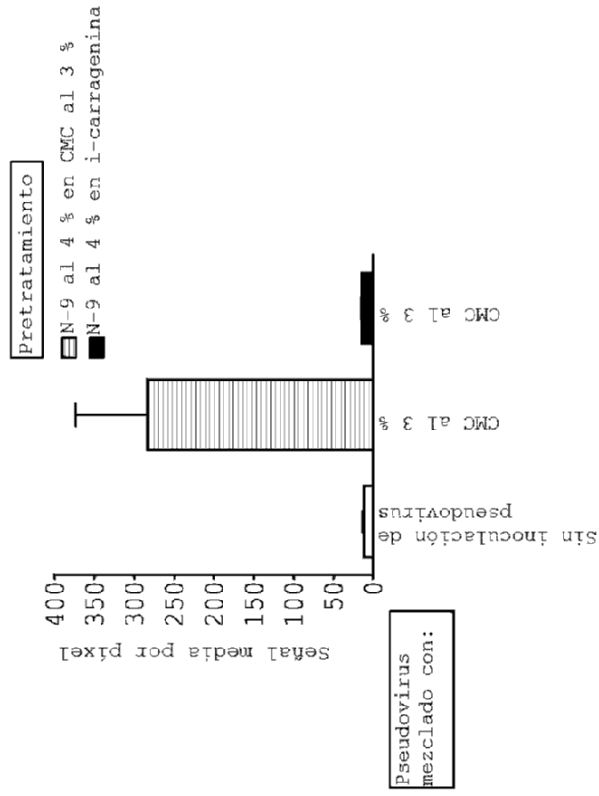


FIG. 1D

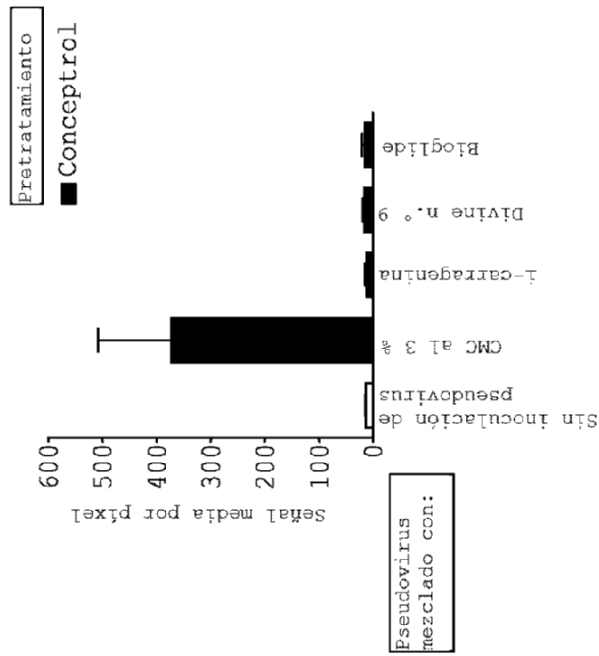


FIG. 1C

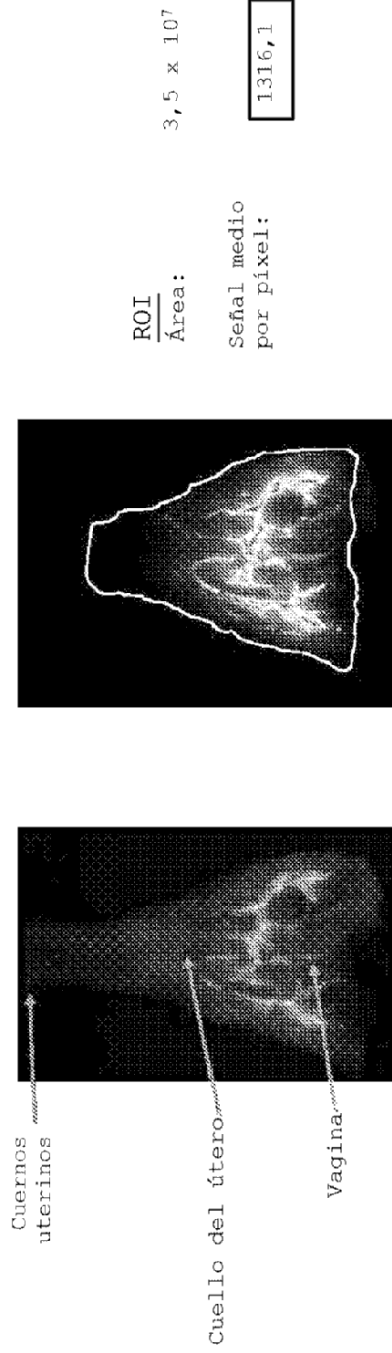
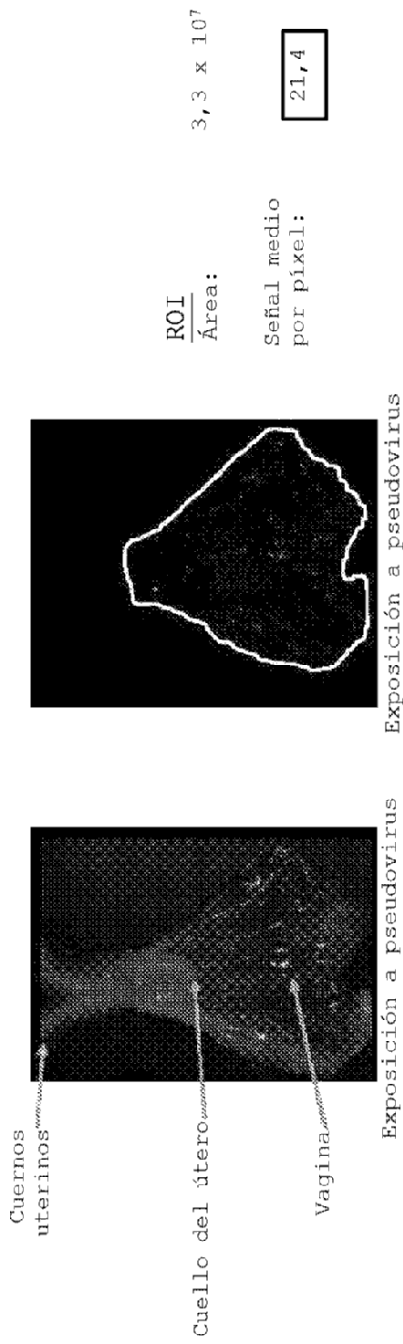
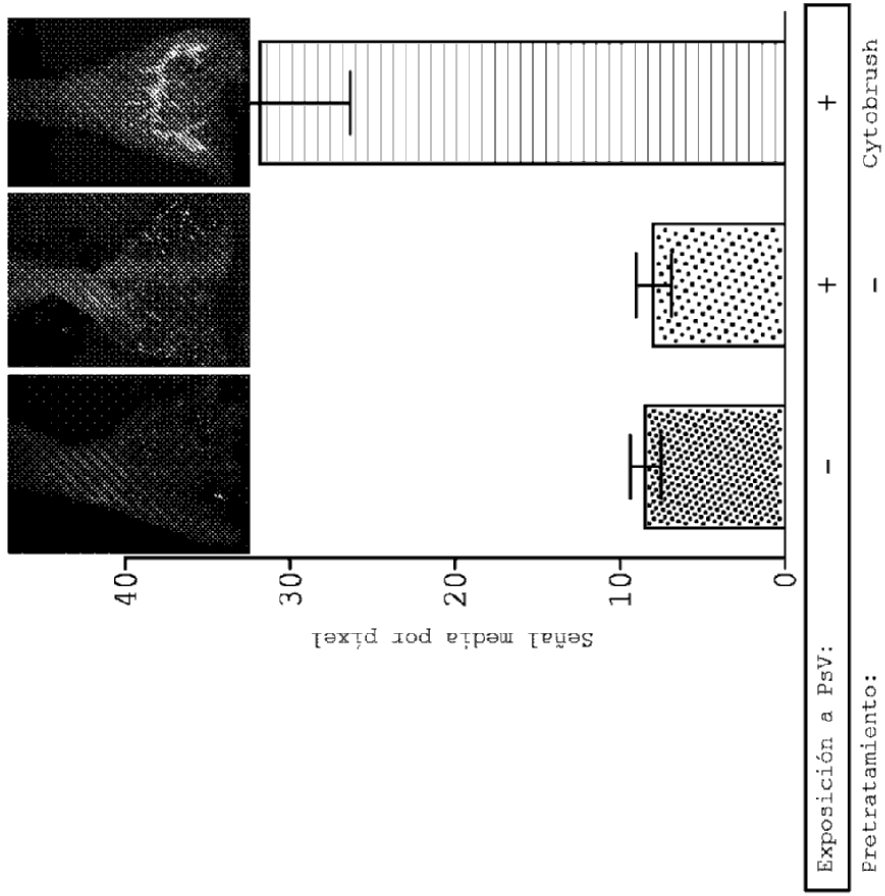


FIG. 2A

FIG. 2B

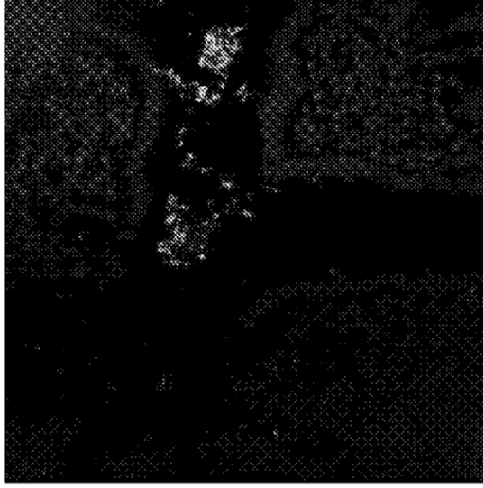
FIG. 2C



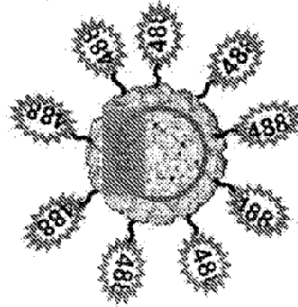
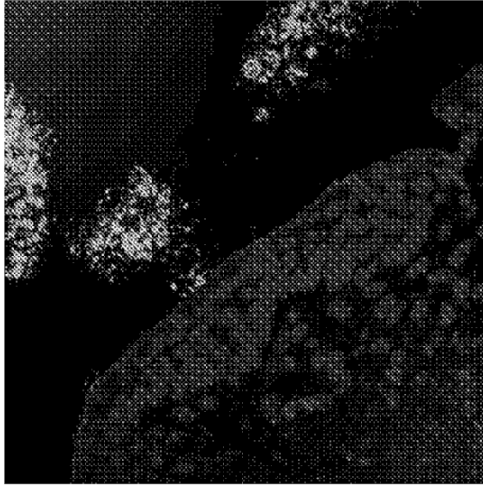
La mucosa cervicovaginal intacta es resistente a la infección por HPV

FIG. 3

Mucosa endocervical



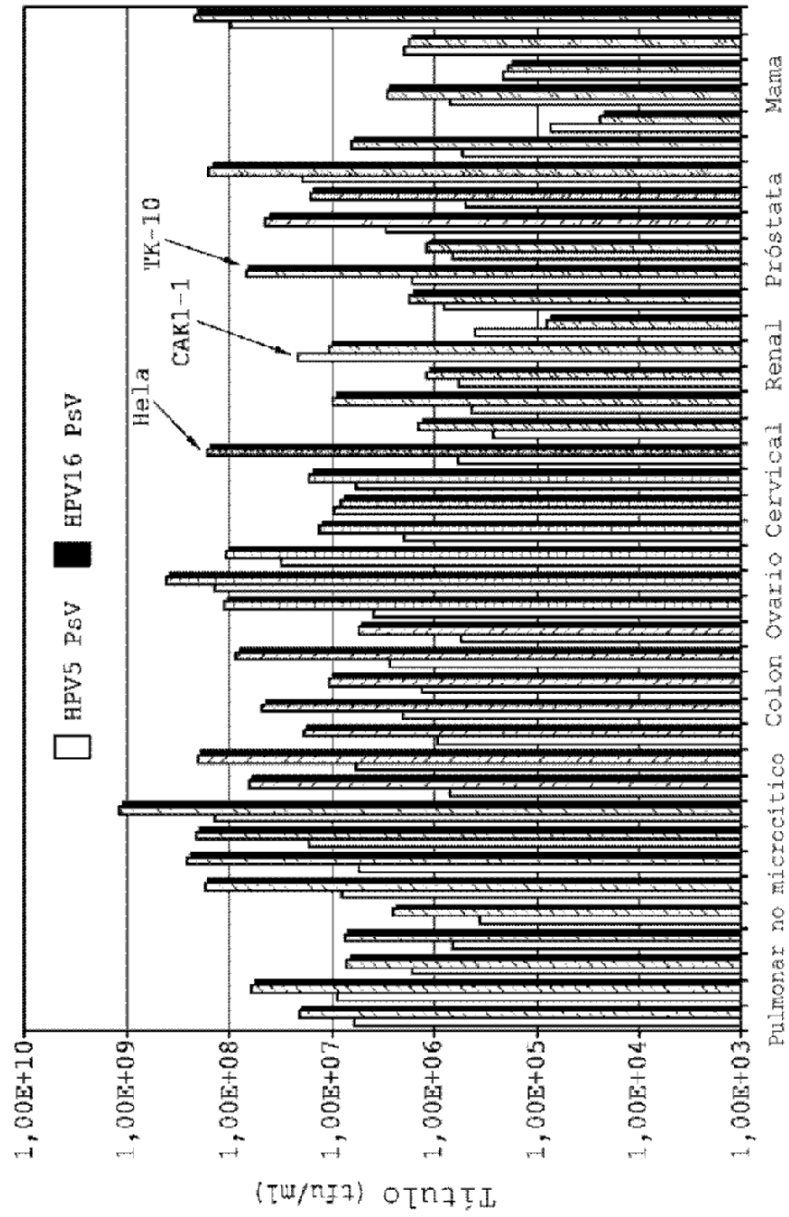
Mucosa vaginal



Verde = cápsidas de HPV acopladas a colorante (infecciosas)

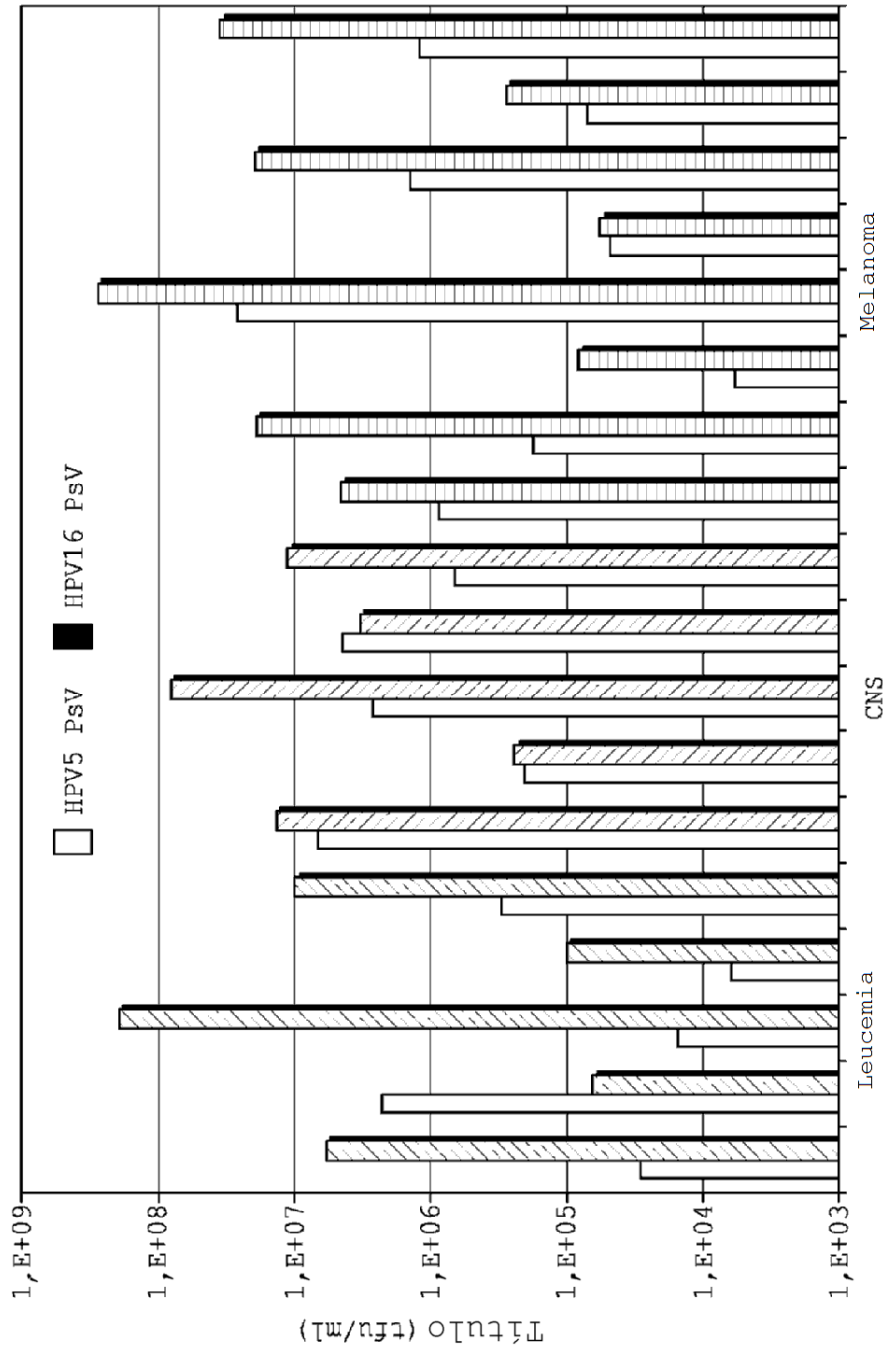
Las cápsidas de HPV no se unen a superficies apicales de epitelio intacto

FIG. 4



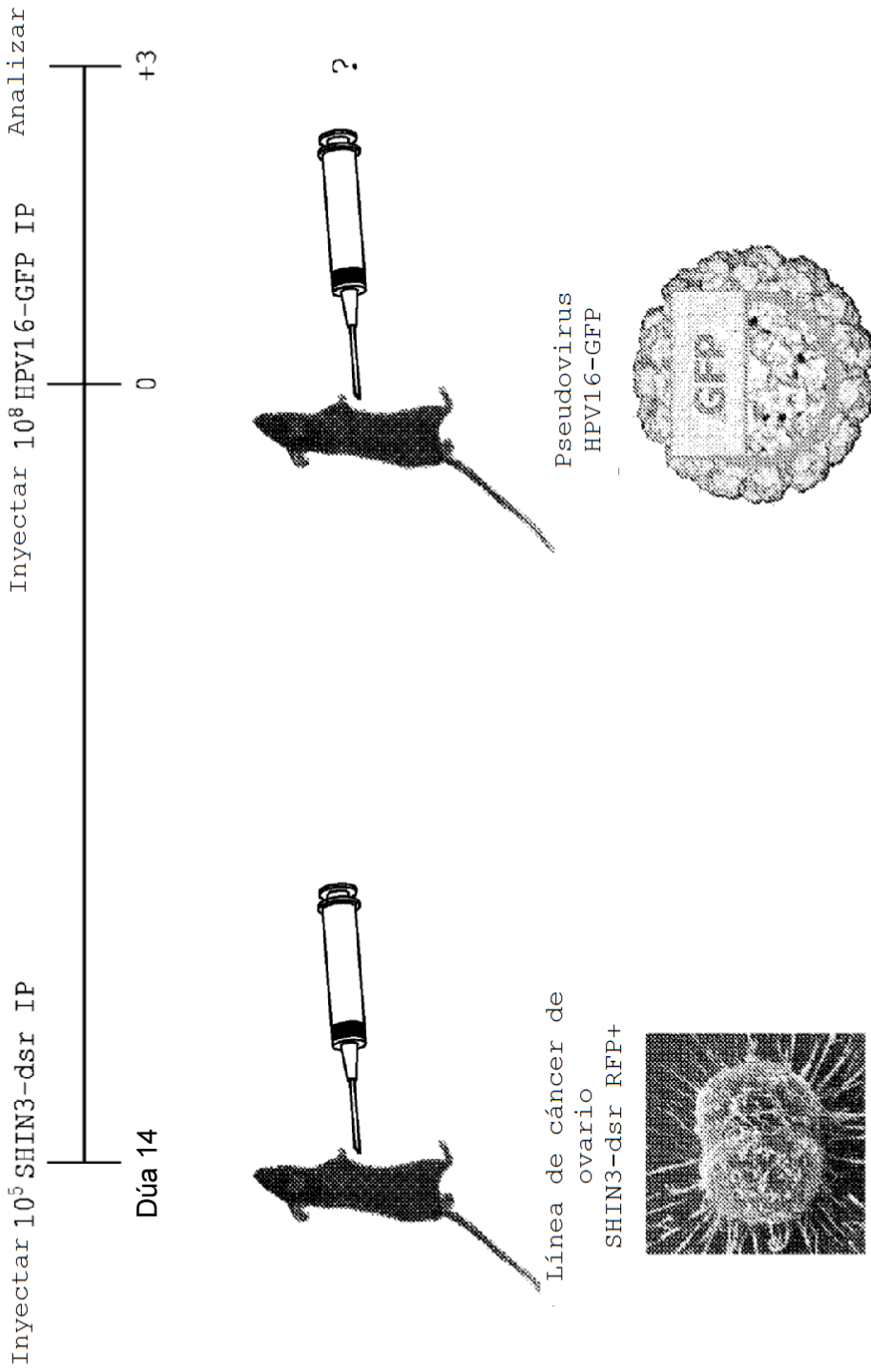
Infectividad de HPV16 y HPV5 PsV en líneas NCI-60: derivadas de tumor epitelial

FIG. 5



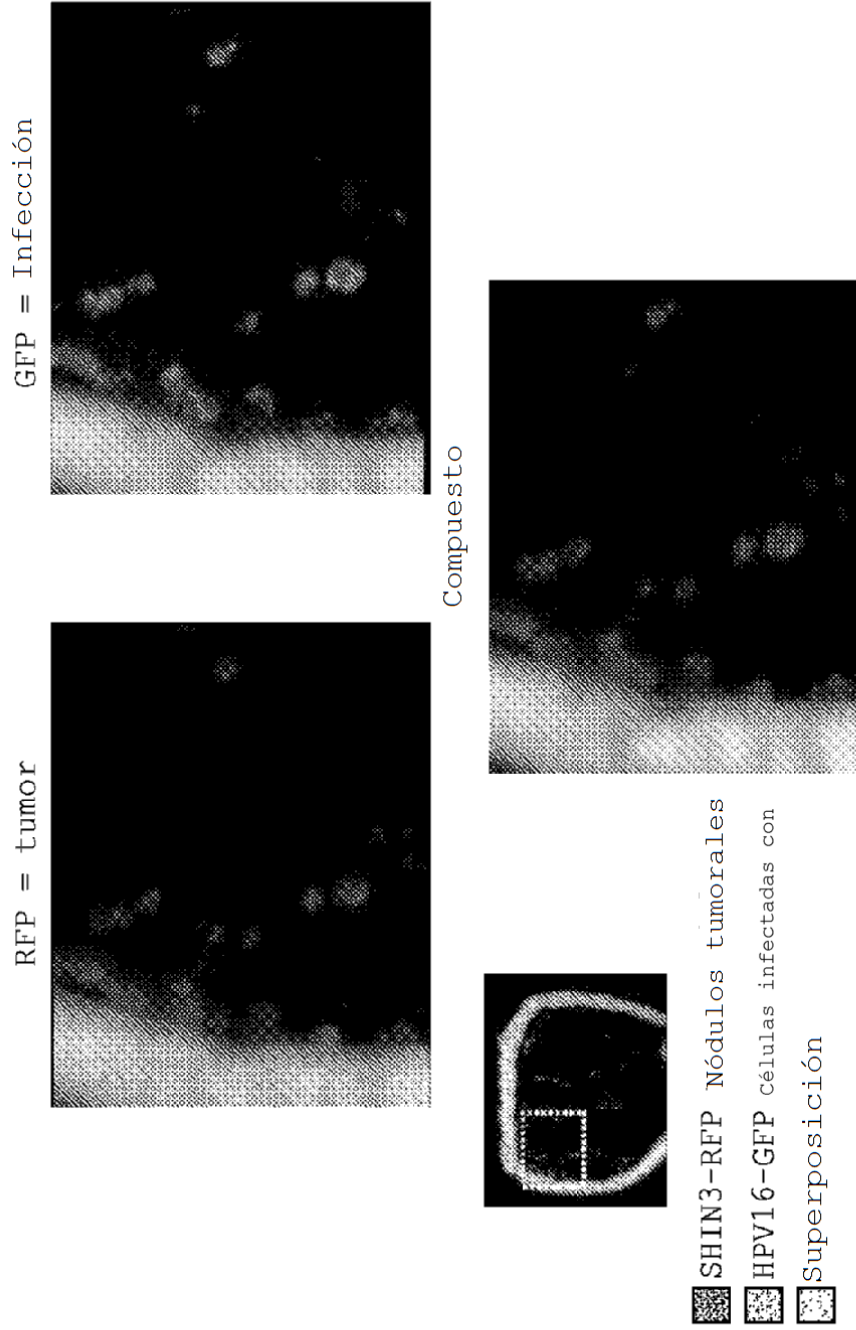
Infectividad de HPV16 y HPV5 PsV en líneas NCI-60: no derivadas de tumor epitelial

FIG. 6



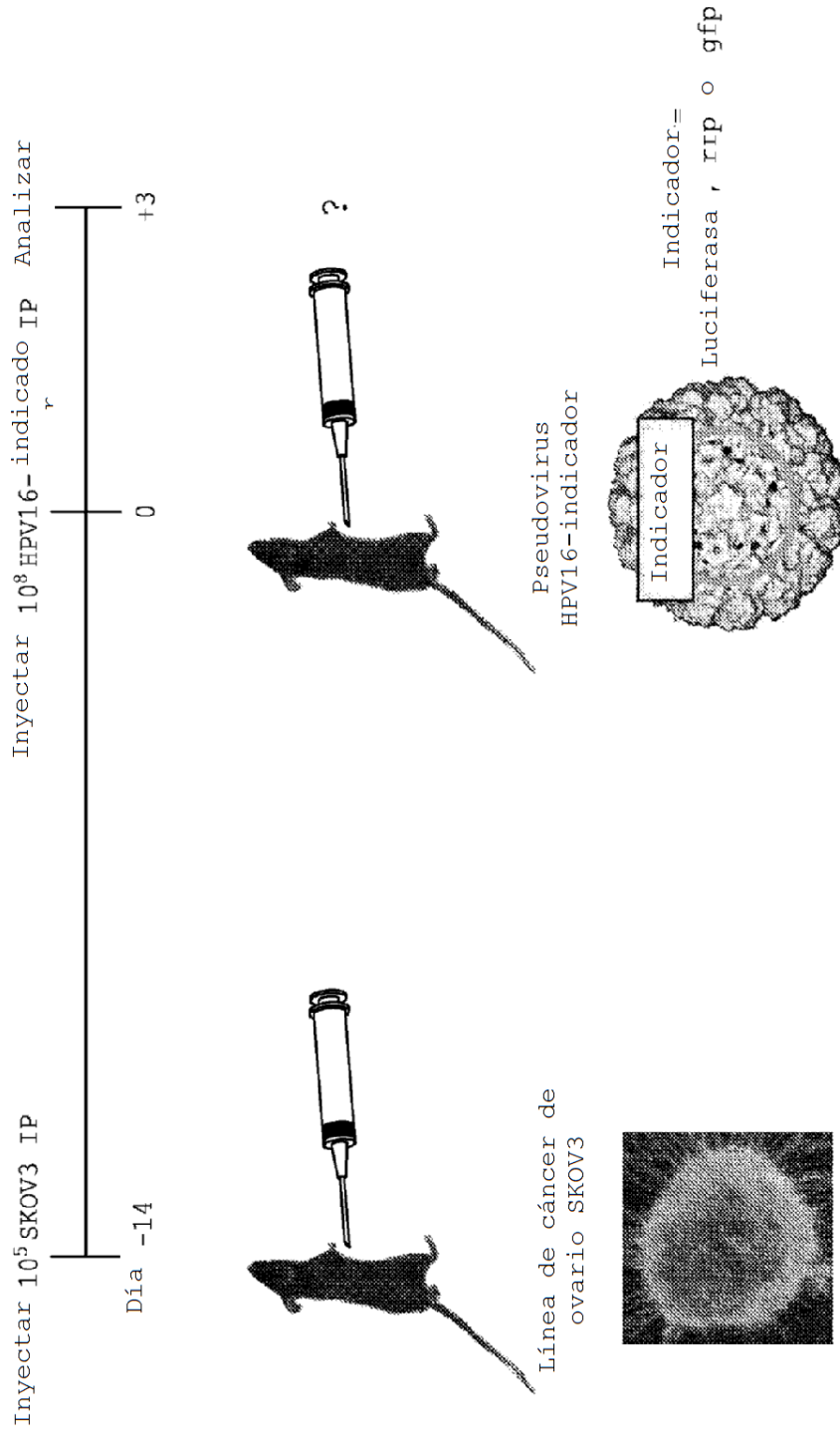
Abordaje de carcinoma de ovario: diseño experimental

FIG. 7



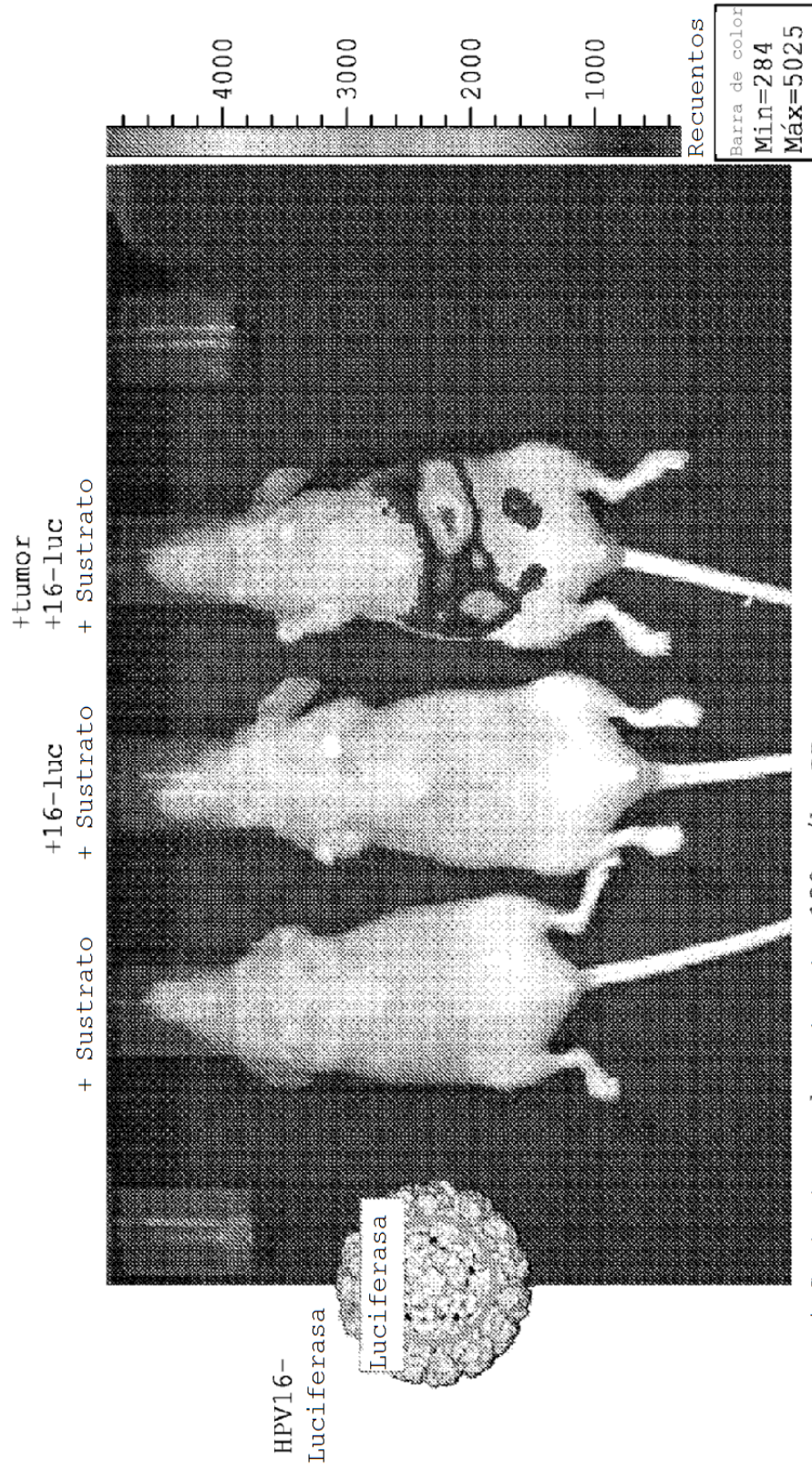
La infección por HPV16-GFP es específica para tejido tumoral

FIG. 8



Abordaje de carcinoma de ovario: diseño experimental

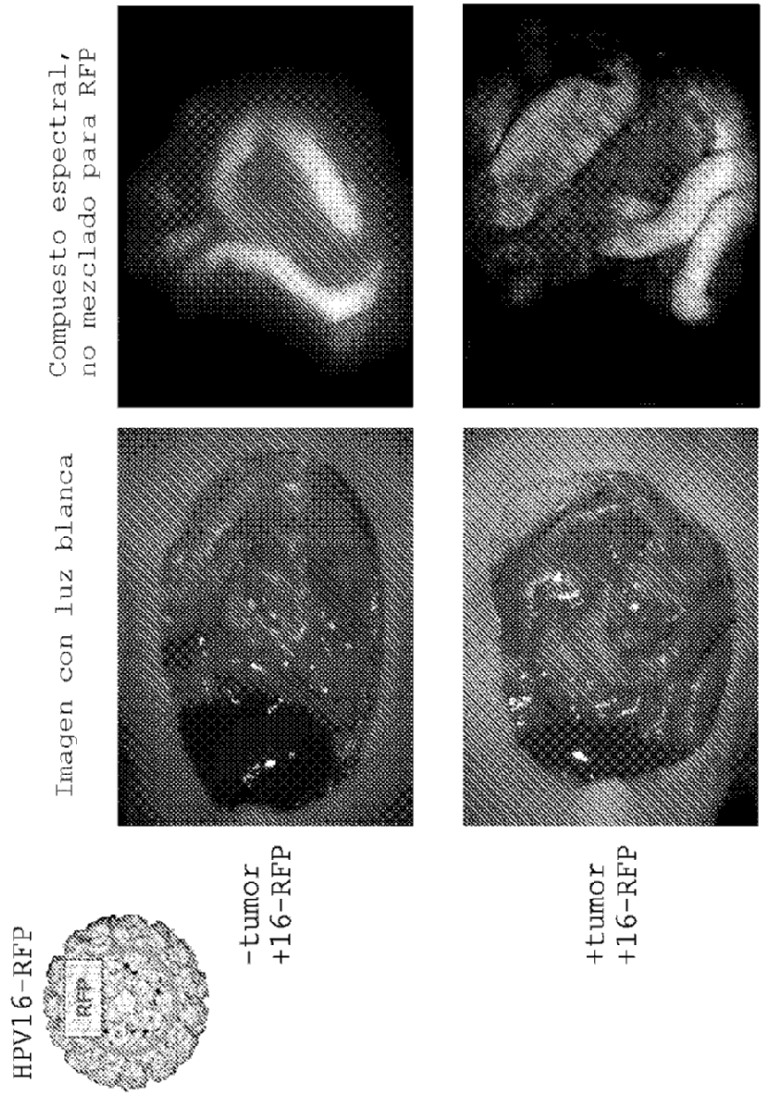
FIG. 9



* Sustrato = d-Luciferina 120mg/kg IP

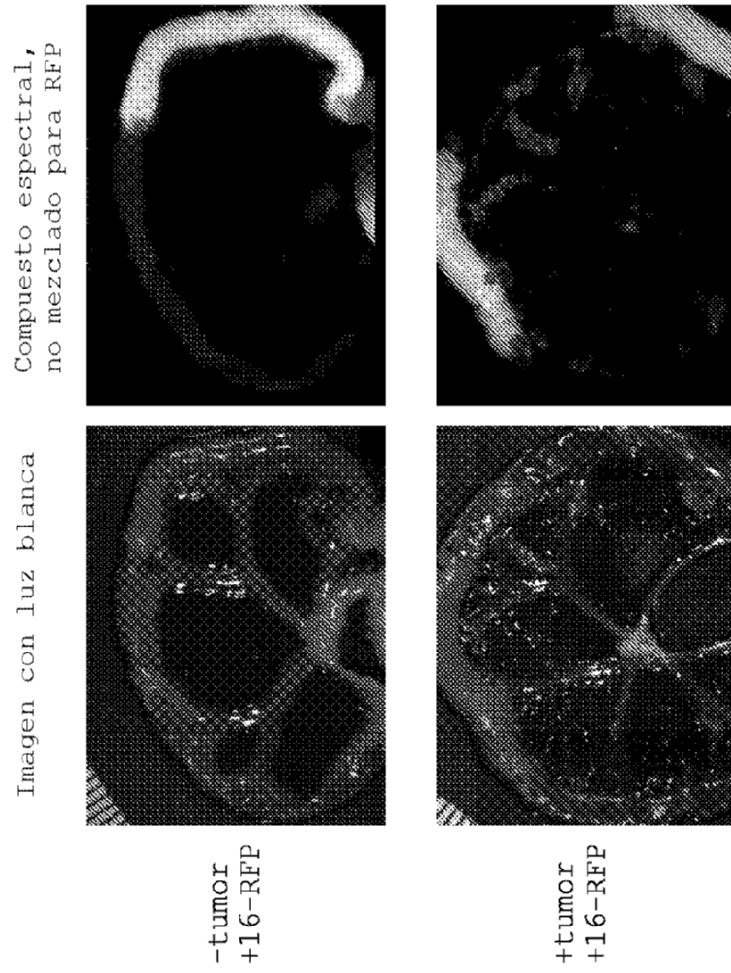
HPV16-luciferasa infecta cuando hay tumor presente

FIG. 10



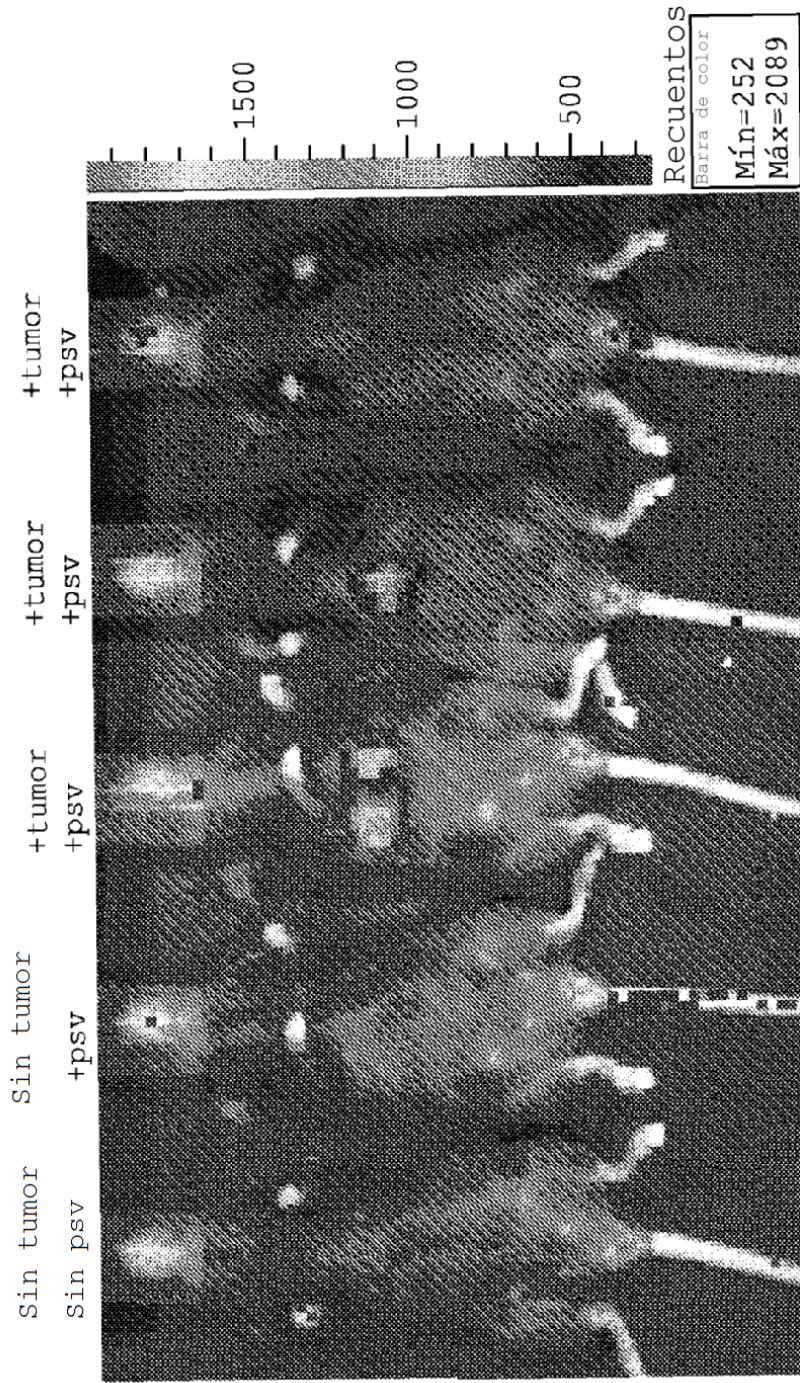
HPV16-RFP aborda SKOV3 In Vivo

FIG. 11



HPV16-RFP aborda SKOV3 In Vivo

FIG. 12



A ratones que albergaban tumor se les inyectó $IV\ 2 \times 10^4$ células TC-1 2 semanas antes del experimento.

Éste es un protocolo establecido para producir metástasis pulmonares.

Los grupos +psv recibieron $IV\ \sim 1 \times 10^7$ HPV16-luciferasa.

No hubo señal detectable en el ratón sin tumor que recibió psv. Pseudovirus administrado IV aborda metástasis tumorales.

FIG. 13