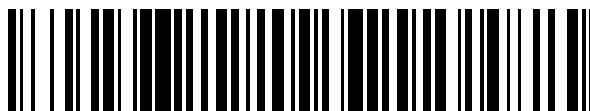


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 546**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010** E 16191371 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019** EP 3159415

54 Título: **Células productoras para vectores retrovirales de replicación competente**

30 Prioridad:

**17.06.2009 US 218063 P**

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

**02.07.2019**

73 Titular/es:

**TOCAGEN INC. (100.0%)  
3030 Bunker Hill Street Suite 230  
San Diego, CA 92109, US**

72 Inventor/es:

**JOLLY, DOUGLAS, J. y  
IBANEZ, CARLOS**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 718 546 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**

Células productoras para vectores retrovirales de replicación competente

**5 Referencia a solicitudes de patente relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad a tenor de 35 U.S.C. §119 sobre la solicitud provisional de n.º de serie 61/218,063, presentada el 17 de junio de 2009.

**10 Campo de la técnica**

La divulgación se refiere a métodos para producir vectores retrovirales recombinantes de replicación competente, líneas celulares útiles para producir tales vectores y métodos de fabricación y utilización de las líneas celulares.

**15 Antecedentes**

El ciclo de vida de los retrovirus implica una etapa donde el material genético del virus se inserta en el genoma de una célula huésped. Esta etapa es esencial porque el ácido nucleico viral insertado, el provirus, se replica a través de la maquinaria de la célula huésped.

20 Como parte de este proceso, el genoma de ARN del retrovirus se replica a través de un intermedio de ADN bicatenario antes de la inserción en el genoma de la célula huésped. La conversión inicial de la molécula de ARN viral en una molécula de ADN de doble cadena (ADNdc) se realiza mediante una transcriptasa inversa. El ADNdc se integra a continuación en el genoma de la célula huésped mediante una integrasa para replicarse adicionalmente  
25 mediante la maquinaria de la célula huésped. La transcriptasa inversa y la integrasa necesarias para la conversión del ARN en ADNdc y para la integración en el genoma del huésped son transportadas dentro de la partícula vírica durante la infección. El ADN proviral se transcribe finalmente utilizando la maquinaria huésped en múltiples copias de ARN. Estas moléculas de ARN se traducen después en péptidos o proteínas virales o se integran en partículas víricas que se liberan de la célula al medio o el medio extracelular.

30 Un genoma de ARN retroviral generalmente comprende 6 regiones típicas que conducen a la expresión de múltiples proteínas. Estas regiones incluyen las secuencias de los genes *gag*, *pol* y *env* asociadas con una señal de empaquetamiento, una señal psi ( $\psi$ ) y flanqueadas por regiones de repetición terminal largas en 5' y / o 3'. El gen *gag* conduce a la expresión de los componentes proteicos del núcleo nucleoproteico del virus, mientras que los productos del gen *pol* están implicados en la síntesis de polinucleótidos y recombinación. El gen *env* codifica los componentes de la envuelta de la partícula de retrovirus. Las regiones LTR 5' y 3' incluyen promotores y ayudan a la integración del genoma viral en el ADN cromosómico de la célula huésped. La señal psi se refiere a la señal de empaquetado retroviral que controla el empaquetamiento eficiente del ARN en la partícula vírica.

40 Debido a su capacidad para formar provirus, los retrovirus son útiles para modificar el genoma de una célula diana o huésped y se han hecho diversas modificaciones a los retrovirus para su uso en terapia génica. La terapia génica usando vectores retrovirales se realiza generalmente añadiendo un polinucleótido heterólogo al genoma viral que codifica o produce un polipéptido o transcrito de interés, empaquetando el genoma recombinante en una partícula vírica e infectando una célula huésped diana. A continuación, la célula diana incorporará el gen exógeno como una  
45 parte de un provirus.

La mayoría de los vectores retrovirales se han vuelto "defectuosos" para evitar la propagación incontrolada y la producción de viriones. Sin embargo, se ha informado poco sobre el desarrollo de sistemas de vectores retrovirales competentes para la replicación.

**50 Sumario**

La divulgación proporciona líneas celulares y células productoras de partículas víricas útiles para producir vectores retrovirales recombinantes competentes para la replicación para terapia génica.

55 La divulgación proporciona generalmente una línea celular productora de retrovirus para la producción de una partícula de retrovirus competente para la replicación, comprendiendo la línea celular una línea celular de fibrosarcoma, de osteosarcoma o de timoma, expresando de forma estable dicha línea celular una genoma retroviral recombinante que comprende un gen *gag*, un gen *pol*, un gen *env*, un polinucleótido heterólogo y un factor psi retroviral ( $\Psi$ ) para el ensamblaje del genoma retroviral recombinante.

60 En un primer aspecto, la presente invención proporciona específicamente una partícula de retrovirus competente para la replicación de acuerdo con la reivindicación 1.

65 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una partícula de retrovirus competente para la replicación de acuerdo con la reivindicación 5.

En una realización, la partícula de retrovirus competente para la replicación se expresa de manera estable. En otra realización, la semivida es mayor que 7 días a 2-8 °C. En otra realización más, las partículas víricas producidas a partir de la línea celular no muestran pérdida de infectividad después de 12 meses de almacenamiento de la línea celular a 65 °C. En otra realización más, el vector producido es aproximadamente 100 % estable durante 3 meses o más y el mismo vector producido a partir de una línea celular transfectada transitoriamente con el mismo retrovirus competente para la replicación pierde al menos cinco veces la actividad a las 2 a 8 semanas en las mismas condiciones de almacenamiento, en comparación con los títulos iniciales. En otra realización más, el retrovirus competente para la replicación comprende: una proteína GAG retroviral; una proteína POL retroviral; una envoltura retroviral; un polinucleótido retroviral que comprende secuencias de repetición terminales largas (LTR) en el extremo 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico gag, un dominio de ácido nucleico pol y un dominio de ácido nucleico env; un casete que comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o un dominio de ácido nucleico regulador unido operativamente a un polinucleótido heterólogo, donde el casete se sitúa de 5' a 3' de LTR y en 3' del dominio de ácido nucleico env que codifica la envoltura retroviral; y secuencias que actúan en cis necesarias para la transcripción inversa, empaquetado e integración en una célula diana, donde el RCR mantiene una mayor competencia de replicación después de 6 pases en comparación con un vector pACE. En una realización, la secuencia polinucleotídica retroviral deriva del virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) o el virus de la leucemia de mono de gibón (GALV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous, el virus de la leucemia de gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV) y el virus felino RD114. En una realización adicional, el MLV es un LMV anfotrópico. En otra realización más, el retrovirus es un gammaretrovirus. En una realización, la secuencia promotora está asociada con un gen regulador del crecimiento. En aún otra realización, el dominio regulador de ácido nucleico comprende un promotor pol II. En otra realización más, la secuencia promotora comprende una secuencia promotora específica de tejido, tal como un elemento de respuesta a andrógenos. En una realización, el elemento de respuesta a andrógenos deriva de un promotor de probasina.

El vector retroviral producido por la línea celular productora comprende varios dominios. Por ejemplo, el promotor comprende un promotor de CMV que tiene una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de una o más bases de ácido nucleico y que es capaz de dirigir e iniciar la transcripción; un polinucleótido del dominio R-U5 de CMV comprende una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos 95 % idénticas a una secuencia como se expone en las SEQ ID N° 19, 20 o 22, donde el polinucleótido estimula la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la misma; el dominio de ácido nucleico gag comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 a aproximadamente el nucleótido 2819 de las SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos una identidad de al menos el 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % con la misma; el dominio pol comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 a aproximadamente el nucleótido 6358 de las SEQ ID NO:19 o 22 o una secuencia que tiene una identidad de al menos 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de la misma; el dominio env comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 a aproximadamente el nucleótido 8323 de las SEQ ID NO:19 o 22 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % de la misma; el IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 8327 a aproximadamente el nucleótido 8876 de las SEQ ID NO:19 o 22 o una secuencia que tiene una identidad de al menos el 95 %, 98 % o 99 % de la misma; y el ácido nucleico heterólogo comprende un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en las SEQ ID NO:3, 5, 11, 13, 15 o 17.

La divulgación también proporciona una preparación libre de células que comprende partículas víricas obtenidas de la línea celular productora de retrovirus descrita en el presente documento. En algunas realizaciones se prepara una preparación farmacéutica a partir de las partículas víricas aisladas.

La divulgación también proporciona un método para producir una línea celular productora de vectores descrita en el presente documento, que comprende transformar una línea celular 293 con un plásmido que codifica un vector retroviral que comprende de 5' a 3': Una fusión CMV-R-U5 del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano con una región R-U5 de MLV; un PBS, sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme en 5'; señal  $\psi$  de empaquetamiento; una secuencia de codificación de gag para el antígeno específico del grupo de MLV; una secuencia de codificación de pol para la poliproteína polimerasa de MLV; un sitio de corte y empalme en 3'; una secuencia de codificación 4070A para la proteína de la cubierta de la cepa 4070A de MLV; un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis o un dominio regulador de ácido nucleico; una secuencia de codificación de la citosina desaminasa modificada; una tira de polipurina; y una repetición terminal larga U3-R-U5 de MLV; cultivar las células 293 para producir partículas víricas; aislar las partículas víricas; infectar una línea celular HT1080 con las partículas víricas, produciendo de este modo una línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación; y adaptar línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación y adaptar la línea celular HT1080 productora de retrovirus para su cultivo en medio sin suero y en suspensión, cultivar la línea celular adaptada en medio sin suero y en suspensión para producir partículas virales, y purificar de manera sustancial las partículas virales.

La divulgación también proporciona un método para producir una composición para terapia génica que comprende cultivar la línea celular descrita en el presente documento para producir partículas víricas y purificar sustancialmente las partículas víricas.

5 La divulgación también proporciona un banco celular que comprende la línea celular de la divulgación. En algunas realizaciones, la línea celular de la divulgación se cultiva en suspensión. En algunas realizaciones, la línea celular de la divulgación se cultiva en medio libre de suero. En alguna realización, la línea celular se cultiva en medio libre de suero.

10 Se presenta una copia electrónica de una lista de secuencias y se incorpora en el presente documento en su totalidad.

Los detalles de una o más realizaciones de la divulgación se exponen en las figuras y la descripción adjunta que se presentan a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la descripción y figuras y de las reivindicaciones.

### Descripción de los dibujos

20 La **Figura 1** muestra un proceso general de producción de una línea celular productora y un banco de la divulgación.

La **Figura 2** muestra un gráfico de datos de muerte celular que muestran que los vectores modificados son más eficaces en comparación con el CD original de tipo salvaje. El gráfico también muestra que la estructura principal modificada (T5.0007) es más eficaz destruyendo que la estructura principal de pACE-CD. También se muestra una tabla que cataloga las diversas construcciones de vectores y sus nombres.

25 La **Figura 3A-F** muestra (a) un esquema de un vector retroviral recombinante de la divulgación; (b y c) un mapa del plásmido de un polinucleótido de la divulgación (Promotor de CMV:1 - 582; R: 583 - 650; U5: 651 - 1202; sitio de unión al cebador (PBS):728 - 776; sitio de corte y empalme en 5': 788 - 789; gag: 1203 - 2819; pol: 2820 - 6358; sitio de corte y empalme en 3': 3314 - 3315; 4070A env: 6359 - 8323; IRES de EMCV: 8327 - 8876; yCD2:8877 - 9353; tira de polipurina (PPT): 9386 - 9404; U3:9405 - 9854; R:9855 - 9921; U5:9922 - 9998; (d y e) a una secuencia de un polinucleótido de la divulgación (SEQ ID NO:19); (f) un esquema de una RCR de primera y segunda generación de la divulgación.

La **Figura 4** muestra que se observan niveles más altos de proteína yCD2 en comparación con la proteína yCD de tipo salvaje en células U - 87 infectadas.

35 La **Figura 5** muestra que un vector de la divulgación es genéticamente estable después de 12 ciclos de pases virales según se evaluó usando amplificación por PCR. La figura también demuestra que los vectores de la divulgación son más estables después de pases más largos comparados con el vector pACE-CD (Kasahara et al.). En particular, pAC3-CD es más estable que pACE- CD, lo que demuestra que la estructura principal cambiada ha hecho que el vector sea más estable. Además, pACE-yCD1 (T5.0001) y -yCD2 (T5-0002) son más estables que pAC-yCD.

40 La **Figura 6A-B** muestra actividad de destrucción de células. (A) Ensayos de muerte celular; y (B) actividad específica de citosina desaminasa de células infectadas con diferentes vectores. (A) muestra que la citosina desaminasa y el vector de la divulgación destruyen las células infectadas al menos tan bien y tal vez mejor que el original pACE-CD cuando las células infectadas con U87 están expuestas a niveles crecientes de 5-FC. (B) muestra que la actividad de CD específica de la divulgación (T5.0007, T5.0001 y T5.0002) está aumentada en comparación con pACE-CD (T5.0000) y es está en el orden T5.0000 <T5. 0007 <T5.0001 <T5.0002.

La **Figura 7** muestra que los tumores U-87 (humanos) tratados con el vector CD de la divulgación (también denominados "Toca 511", "pAC3-yCD2 (V)" y "T5.0002", véase, por ejemplo, la Figura 2) *in vivo* y explantados de ratones tratados con 4 ciclos de 5-FC siguen siendo sensibles al fármaco.

50 La **Figura 8** muestra información de dosificación en un modelo de ratón de xenoinjerto humano (U87) de cáncer de cerebro.

La **Figura 9** muestra información de dosificación y el efecto terapéutico en un modelo de ratón singénico.

La **figura 10** muestra las curvas de dosis de potencia (véase el ejemplo 8) para el lote T003-002-40L (sin diluir y a 1/100) a los 12 meses a  $\leq -65$  °C.

55 La **figura 11** muestra curvas de COSE de potencia para 3 lotes, M100-09 (dosis alta), M101-09 (dosis media) y M102-09 (dosis baja) a los 6 meses a  $\leq -65$  °C.

La **figura 12** muestra los títulos diarios de los candidatos clonales HT1080 + T5.0002 para la producción de títulos de cultivos confluentes.

La **figura 13** muestra la propagación viral del vector T5.0006 (GFP) en tres líneas celulares de glioma canino a los días 1, 3 y 6 días de infección.

60 La **figura 14** muestra las tendencias de los títulos medidos de los lotes T003-002-40L y GMP a  $\leq -65$  °C durante 12 meses.

La **figura 15** muestra análisis de la transducción de Toca 511 y Toca 621 sobre la cinética del crecimiento de células tumorales S91 subQ. Se inyectaron tumores S91 con el vector 10 días después de la implantación.

65 La **figura 16** muestra la extensión de T5.0006 purificado (vector GFP) producido en una línea productora estable a través de tumores subcutáneos U87 en ratones desnudos, con el tiempo (0, 5, 9, 12, 26 días).

**Descripción detallada**

5 Como se usa en el presente documento y las reivindicaciones adjuntas, las formas "uno", "una" y "el" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales genes y la referencia a "el vector" incluye la referencia a uno o más vectores, y así sucesivamente.

10 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente divulgación pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica de los métodos y composiciones divulgados se pueden usar cualquier método y reactivo similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación se describen ejemplos de métodos y materiales.

15 Asimismo, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique lo contrario. De forma similar, "comprenden", "comprende", "que comprende", "incluyen", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitantes.

20 También se entenderá que cuando las descripciones de diversas realizaciones usan el término "que comprende", los expertos en la técnica entenderían que, en algunos casos específicos, una realización se puede describir de forma alternativa utilizando un lenguaje "consistente esencialmente en" o "que consiste en".

25 Las publicaciones tratadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan ricamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. En el presente documento nada se tiene que interpretar como admisión de que los inventores no tienen el derecho de antedatar dicha divulgación en virtud de la divulgación previa.

30 El término "RCR" tal como se utiliza en el presente documento pretende significar un retrovirus competente para la replicación (RCR). Un virus competente para la replicación es una partícula vírica que tiene la capacidad para replicarse por sí misma en una célula huésped.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "vector plasmídico de RCR" significa un plásmido que incluye todo o parte de un genoma retroviral, que incluye secuencias retrovirales de repetición largas (LTR), una señal de empaquetamiento ( $\psi$ ), y pueden incluir uno o más polinucleótidos que codifican una o más proteínas o polipéptidos de interés, tal como un agente terapéutico o un marcador seleccionable. El término "terapéutico" se usa en un sentido genérico e incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos y agentes de reemplazo.

40 Los términos "que transfecta" o "transfección" tal como se usan en el presente documento, se entiende que significan la transferencia de al menos un ácido nucleico exógeno en una célula. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN o una combinación de ambos. El ácido nucleico exógeno se refiere a un ácido nucleico que no se encuentra como resultado de la división celular del huésped o la multiplicación de la célula huésped.

Con el término "virus" tal como se usa en el presente documento se pretende significar el virus físico o partícula de retrovirus.

45 La expresión "línea celular", como se usa en el presente documento, se refiere a células cultivadas que se pueden pasar (dividir) más de una vez. La divulgación se refiere a líneas celulares que se pueden pasar más de 2 veces, hasta 200 veces o más e incluye cualquier número entero entre ellas.

50 Las expresiones "expresión estable" y "que se expresa de forma estable" como se usa en el presente documento se entiende que significan que el material genético se está expresando de forma estable y/o está integrado de forma permanente y estable en el genoma de la célula huésped y, por lo tanto, tiene el mismo potencial de expresión en el tiempo que el material genético nativo de la célula huésped.

55 Las expresiones "expresión transitoria" y "que se expresa de forma transitoria" como se usa en el presente documento se entiende que significan que el periodo de expresión del material genético es temporal y/o no está integrado de forma permanente y estable en el genoma de la célula huésped y, por lo tanto, no tiene el mismo potencial de expresión en el tiempo que el material genético nativo de la célula huésped.

60 Como se usa en el presente documento, el término secuencia de ácido nucleico "heteróloga" o transgén se refiere a (i) una secuencia que normalmente no existe en un retrovirus de tipo salvaje, (ii) una secuencia que se origina a partir de una especie extraña o (iii) si procede de la misma especie, se puede modificar sustancialmente de su forma original. Como alternativa, una secuencia de ácido nucleico sin cambios que no se expresa normalmente en una célula es una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

65 El término "terapéutico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una acción que previene, invierte o retarda el curso natural de una enfermedad o sus síntomas. Una acción terapéutica puede ser preventiva, curativa

o simplemente paliativa y no significa que el paciente humano o animal afectado no muera de la enfermedad.

En una realización, una línea celular productora de la divulgación es capaz de crecer en suspensión o en un medio libre de suero. La línea celular productora también puede crecer tanto en medio libre de suero como en suspensión simultáneamente. Aunque el medio libre de suero y la capacidad para crecer en suspensión son las condiciones típicas, las células de la divulgación (por ejemplo, células 293T) pueden cultivarse de manera adherente con medio que contenga suero normal para lograr fines concretos. Tales fines pueden ser, por ejemplo, facilitar la transfección de células o seleccionar clones de células. En la presente invención, la línea celular HT1080 se ha adaptada para crecer en medio libre de suero y en suspensión.

El tipo de células productoras utilizadas para generar el retrovirus (descrito con más detalle a continuación) es útil para la producción de partículas víricas competentes para la replicación para liberación génica y terapia génica.

La divulgación proporciona un método para generar una línea celular productora que comprende transformar o transfectar un primer tipo de células de mamífero con un vector de plásmido de RCR de la divulgación, cultivar el primer tipo de célula para producir partículas retrovirales, obtener un medio libre de células del primer tipo celular que produce las partículas retrovirales, donde el medio libre de células comprende partículas retrovirales, poner en contacto un segundo tipo de célula de mamífero con el medio para infectar el segundo tipo de células y cultivar el segundo tipo de células para producir una línea celular productora que produce un vector retroviral competente para la replicación para su uso en la transformación de células de mamíferos. El primer tipo de célula puede ser casi cualquier tipo de célula de mamífero que sea capaz de producir virus después de la transfección y puede incluir células HeLa, COS, de ovario de hámster chino (CHO) y HT1080, y la transfección puede ser con fosfato cálcico u otros agentes, tales como formulaciones lipídicas conocidas por los expertos en la técnica como útiles para la transfección.

En la presente invención, el primer tipo de célula es una célula 293 humana (también denominada a menudo células HEK 293, células 293, o menos exactamente células HEK), que son una línea celular derivada originalmente de células renales embrionarias humanas cultivadas en cultivo tisular. Las células HEK 293 se generaron mediante la transformación de cultivos de células renales embrionarias humanas normales con ADN de adenovirus 5 cortados. Las células HEK 293 son fáciles de cultivar y transfectar muy fácilmente y se han usado ampliamente en la investigación de biología celular durante muchos años. También se usan en la industria biotecnológica para producir proteínas y virus terapéuticos para terapia génica.

En otra realización, el primer tipo de célula es una célula de mamífero transformada con un antígeno T grande de SV40. En una realización concreta se utilizan células 293T HEK. Una variante importante de esta línea celular es la línea de células 293T que contiene el antígeno T grande de SV40, lo que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación de SV40. Esto permite la amplificación de los plásmidos transfectados y la expresión temporal extendida de los productos génicos deseados.

El término "célula 293 humana", tal como se utiliza en el presente documento, incluye la línea celular HEK 293T, la línea celular 293 humana (ATCC N.º CRL 1573) (Graham et al., J. Gen. Virol., Vol. 36, páginas 59-72 (1977)), o una línea celular formada mediante transfección de células 293 con uno o más vehículos de expresión (por ejemplo, vectores plasmídicos), incluyendo polinucleótidos que codifican diversas proteínas *gag*, *pol* y *env*. La envoltura puede ser una envoltura anfotrópica, una envoltura ecotrópica, una envoltura xenotrópica, una envoltura GALV, una envoltura RD114, una envoltura FeLV u otra envoltura retroviral. La envoltura también puede ser una envoltura de una fuente heteróloga, tal como una envoltura de alfavirus. Tales células también pueden incluir otros polinucleótidos tales como, por ejemplo, polinucleótidos que codifican marcadores seleccionables. Ejemplos de tales líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, 293T/17 (ATCC No. CCRL 11268); Anjou 65 (ATCC N.º CCRL 11269); Bosc 23 (CCRL 11270); y CAK8, también conocida como la línea celular (ATCC N.º CCRL 11554).

El primer tipo de célula (por ejemplo, células HEK 293T) puede transformarse con un vector plasmídico RCR de la divulgación en cualquier número de medios, incluyendo fosfato de calcio y similares. En la técnica se conocen las condiciones de cultivo típicas para células de mamífero, en particular células 293 humanas.

Una vez transformado el primer tipo de célula, se cultiva en condiciones para la producción de partículas víricas. Tales condiciones incluyen típicamente células de realimentación en medios apropiados, CO<sub>2</sub> y humedad. Las condiciones de cultivo también pueden incluir la adición de antibióticos, antifúngicos, factores de crecimiento y similares. Típicamente, el medio de realimentación se recoge después de 24, 48, 72 o 96 horas, y tal procedimiento se conoce como procedimiento de transfección de expresión transitoria.

Los medios de las células cultivadas anteriores pueden usarse directamente en cultivos adicionales. Como alternativa, las partículas víricas en el medio de células cultivadas pueden aislarse usando cualquier número de técnicas conocidas en la materia, incluyendo centrifugación, técnicas de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio aniónico y similares.

Cuando el medio se usa directamente, los medios se pueden añadir al medio utilizado en el cultivo del segundo tipo

celular. Cuando las partículas víricas se purifican en primer lugar sustancialmente, las partículas pueden lavarse o resuspenderse en un tampón o medio apropiado o en una concentración particular para la infectividad antes de la adición al segundo tipo celular, dando lugar a la generación de una línea celular productora de expresión estable.

5 En la presente invención, el segundo tipo celular es una línea celular HT1080 o un derivado de la misma. La línea celular HT1080 de fibrosarcoma humano (ATCC, n.º de catálogo CCL-121) se puede obtener directamente de la colección Americana de Cultivos Tipo (P.O. Box 1549, Manassas, VA). El método incluye infectar las células HT1080 con un RCR de la divulgación para proporcionar una célula huésped transfectada de forma estable. La célula huésped transfectada de forma estable puede cultivarse para producir partículas víricas para su uso en terapia  
 10 génica o liberación génica o puede "depositarse en el banco" para su uso posterior, y puede ser un grupo de células transfectadas o una línea celular clonada. Las células depositadas en el banco se pueden congelar y almacenar usando técnicas conocidas en la materia.

15 Típicamente, las células se cultivarán en medio libre de suero. En una realización, las células se cultivan en un medio libre de animales o un medio definido utilizado para la preparación de sustancias biológicas para su administración a seres humanos. En la presente invención, la línea celular HT180 productora de retrovirus se ha adaptado para crecer en medio libre de suero y en suspensión.

20 Inesperadamente, el proceso descrito anteriormente produce partículas víricas para terapia génica a partir de la línea celular productora de expresión estable que tienen una estabilidad incrementada en comparación con la partícula vírica producida mediante un procedimiento de expresión transitoria.

25 La partícula vírica de RCR (por ejemplo, AC3-yCD2 (V)) se puede purificar sustancialmente a partir de los medios de las células HT1080 + T5.002. El vector purificado puede lavarse, diluirse y resuspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado. Como alternativa, el vector purificado puede almacenarse por congelación o liofilización.

30 En una realización, AC3-yCD2 (V) se administrará como partículas retrovirales en solución. La formulación del vector lleno final se denomina Toca 511 y se suministrará como una solución acuosa estéril que contiene los siguientes excipientes de formulación (en mg / ml): sacarosa 10,0, manitol 10,0, NaCl 5,3, seroalbúmina humana (HSA, Baxter) 1,0 y ácido ascórbico 0,10.

35 Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, se puede usar cualquier número de vectores retrovirales de la divulgación con la línea celular productora y el proceso divulgados en el presente documento.

40 En los ejemplos específicos proporcionados en el presente documento, TOCA 511 se usa para demostrar los métodos y composiciones de la invención. Como se describe en el presente documento, TOCA 511 se refiere a un vector retroviral competente para la replicación codificado en un plásmido designado pAC3-yCD2 (también conocido como T5.0002). El vector viral está compuesto por un retrovirus competente para la replicación derivado de un virus de la leucemia murina (MLV) que codifica todos los componentes retrovirales (*gag*, *pol* y *env*) requeridos para la replicación viral, con la envoltura ecotrópica original reemplazada con la envoltura anfotrópica del virus 4070A.

45 El vector TOCA 511 codifica un gen de la citosina desaminasa (CD) de levadura. Esta secuencia génica se ha insertado aguas abajo de un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) derivado del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), que se inserta aguas abajo del gen *env* viral como se muestra en la Figura 5, a continuación. El gen en el vector TOCA 511 es un gen modificado de la citosina desaminasa de levadura. La justificación del uso de un gen de la CD modificado es permitir una conversión *in vivo* más eficiente del profármaco flucitosina oral (5-FU) en el agente citotóxico activo fluorouracilo (5-FU).

50 Los métodos y composiciones de la divulgación son aplicables a otros vectores y vectores retrovirales recombinantes. La divulgación describe varios vectores de modificación y recombinantes que pueden ser producidos por las líneas celulares y métodos de la divulgación.

55 Los métodos y líneas celulares de la divulgación incluyen construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias de ácido nucleico que codifican un ácido nucleico heterólogo de interés (por ejemplo, una citosina desaminasa, tal como los polinucleótidos y polipéptidos proporcionados en las SEQ ID NO: 1-13), un gen de interferón gamma o cualquiera de un número de genes terapéuticos, tales como los divulgados en la solicitud de patente publicada WO2010036986. En una realización, el vector viral es un vector retroviral.

60 Los términos "vector", "construcción vectorial" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula huésped, con el fin de transformar el huésped y estimular la expresión (por ejemplo, la transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores típicamente comprenden el ADN de un agente transmisible, donde se inserta ADN extraño que codifica una proteína mediante tecnología de enzima de restricción. Un tipo habitual de vector es un "plásmido",  
 65 que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede introducirse fácilmente en una célula huésped adecuada. Un gran número de vectores,

- incluyendo plásmidos y vectores fúngicos, se han descrito para la replicación y / o expresión en diversos huéspedes eucariotas y procariontes. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen plásmidos pKK (Clontech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, Wis.), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, CA) o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y muchas células huésped apropiadas, usando métodos divulgados o citados en el presente documento o conocidos de otro modo por los expertos en la técnica relevante. Los vectores de clonación recombinantes incluirán a menudo uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el huésped, por ejemplo resistencia a los antibióticos y uno o más casetes de expresión.
- Los términos "expresa" y "expresión" significan permitir o hacer que la información en un gen o secuencia de ADN se manifieste, por ejemplo produciendo una proteína activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un correspondiente gen o secuencia de ADN. Una secuencia de ADN se expresa dentro o a través de una célula para formar un "producto de expresión" tal como una proteína. El propio producto de expresión, por ejemplo, la proteína resultante, también se puede decir que es "expresado" por la célula. Un polinucleótido o polipéptido se expresa de forma recombinante, por ejemplo, cuando se expresa o se produce en una célula huésped extraña, bajo el control de un promotor extraño o nativo, o en una célula huésped nativa bajo el control de un promotor extraño.
- En una realización, el vector es un vector viral. En una realización adicional, el vector viral es un vector retroviral competente para la replicación capaz de infectar solo las células de mamífero en replicación. Los retrovirus se han clasificado de varias maneras, pero la nomenclatura se ha normalizado en la última década (véase ICTVdB - The Universal Virus Database, v 4 en la red en [ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/](http://ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/) y el libro de texto "Retroviruses," Eds. Coffin, Hughs y Varmus, Cold Spring Harbor Press 1997. El vector retroviral competente para la replicación deriva de la familia de virus Retroviridae y puede comprender un miembro de la subfamilia de Orthoretrovirinae, o más típicamente comprende un retrovirus del género gammaretrovirus. En una realización, un vector retroviral competente para la replicación comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en 5' un polinucleótido que codifica una citosina desaminasa. En una realización, el polinucleótido que codifica una citosina desaminasa está en 3' de un polinucleótido de *env* de un vector retroviral.
- La divulgación proporciona vectores retrovirales modificados. Los vectores retrovirales modificados pueden derivar de miembros de la familia retroviridae. La clasificación de esta familia ha cambiado varias veces durante los últimos diez a quince años. En la actualidad, la familia Retroviridae se compone de dos subfamilias: Spumaretrovirinae, que tiene un solo género, espumavirus (o virus espumosos), tal como el virus espumoso humano y de simio (HFV), y la subfamilia Orthoretrovirinae, que tiene 6 géneros, betaretrovirus (por ejemplo, MMTV), gammaretrovirus (por ejemplo, MLV), alfaretrovirus (por ejemplo ALV), deltaetrovirus (por ejemplo, BLV y HTLV-1) lentivirus (por ejemplo, VIH 1) y retrovirus epsilon. Estas clasificaciones se hacen sobre la base de características moleculares comunes, tales como los marcos de lectura relativos para *gag*, *pol* y *env*, el procesamiento de las poliproteínas, los ARNt individuales usados para cebar la transcripción inversa y la naturaleza de las estructuras LTR. El método original de clasificación de retrovirus fue en los grupos A, B, C y D sobre la base de la morfología de las partículas, como se observó en el microscopio electrónico durante la maduración viral. Las partículas de tipo A representan las partículas inmaduras de los virus de tipo B y D observadas en el citoplasma de las células infectadas. Estas partículas no son infecciosas. Las partículas de tipo B brotan como viriones maduros de la membrana plasmática mediante la envoltura de partículas intracitoplásmicas de tipo A. En la membrana poseen un núcleo toroidal de 75 nm, del cual se proyectan proyecciones de glicoproteínas largas. Después de la gemación, las partículas de tipo B contienen un núcleo excéntrico denso para los electrones. El betaretrovirus virus de tumor mamario de ratón (MMTV) tiene una morfología de tipo B, pero los betaretrovirus también pueden tener una estructura de tipo D. Las partículas de tipo D se asemejan a las partículas de tipo B en que muestran como estructuras anulares en el citoplasma celular infectado, que brotan de la superficie de la célula, pero el virión incorpora proyecciones cortas de glicoproteínas en la superficie. Los núcleos densos para los electrones también están localizados excéntricamente dentro de las partículas. El virus Mason Pfizer de mono (MPMV), también un betaretrovirus, es el prototipo de virus de tipo D. No se pueden observar partículas intracitoplásmicas en las células infectadas por virus de tipo C. En su lugar, las partículas maduras brotan directamente de la superficie celular a través de una condensación en forma de 'C' creciente que luego se cierra sobre sí misma y queda encerrada por la membrana plasmática. Las proyecciones de glicoproteína de la envoltura pueden ser visibles, junto con un núcleo uniformemente denso para los electrones. La gemación se puede producir desde la membrana plasmática superficial o directamente en vacuolas intracelulares. Los alfaretrovirus, los gammaretrovirus, los deltaetrovirus y los epsilonetrovirus tienen el aspecto estructural del tipo C.
- Los retrovirus se definen por la forma en que replican su material genético. Durante la replicación, el ARN se convierte en ADN. Después de la infección de la célula, se genera una molécula de doble cadena de ADN a partir de las dos moléculas de ARN que se transportan en la partícula vírica mediante el proceso molecular conocido como transcripción inversa. La forma de ADN se integra covalentemente en el genoma de la célula huésped como un provirus, a partir del cual se expresan ARN víricos con la ayuda de factores celulares y / o víricos. Los ARN víricos expresados se empaquetan en partículas y se liberan como virión infeccioso.
- La partícula de retrovirus está compuesta por dos moléculas de ARN idénticas. Cada genoma de tipo silvestre tiene



una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo, que está protegida en el extremo 5' y poliadenilada en la cola 3'. La partícula del virus diploide contiene las dos cadenas de ARN en complejo con proteínas *gag*, enzimas víricas (productos del gen *pol*) y moléculas de ARNt del huésped dentro de una estructura 'núcleo' de proteínas *gag*. Alrededor y de esta cápside y protegiéndola hay una bicapa lipídica, derivada de las membranas de las células huésped y que contiene proteínas de la envoltura vírica (*env*). Las proteínas *env* se unen a un receptor celular para el virus y la partícula entra típicamente en la célula huésped a través de endocitosis mediada por receptor y / o fusión de membrana.

Después de que la envoltura externa se desprende, el ARN del virus se copia a ADN mediante transcripción inversa. Esto está catalizado por la enzima transcriptasa inversa codificada por la región *pol* y utiliza el ARNt de la célula huésped empaquetado en el virión como cebador para la síntesis de ADN. De esta manera, el genoma del ARN se convierte en el genoma de ADN más complejo.

El ADN lineal bicatenario producido mediante transcripción inversa puede o no tener que circularizarse en el núcleo. Ahora, el provirus tiene dos repeticiones idénticas en cada extremo, conocidas como repeticiones terminales largas (LTR). Los extremos de las dos secuencias LTR producen el sitio reconocido por un producto de *pol*, la proteína integrasa, que cataliza la integración, de tal manera que el provirus está siempre unido a dos pares de bases (pb) del ADN del huésped desde los extremos de las LTR. Se observa una duplicación de secuencias celulares en los extremos de ambas LTR, que recuerdan el patrón de integración de elementos genéticos transponibles. Se piensa que la integración ocurre esencialmente de forma aleatoria dentro del genoma de la célula diana. Sin embargo, modificando las repeticiones terminales largas es posible controlar la integración de un genoma de retrovirus.

La transcripción, el corte y empalme del ARN y la traducción del ADN vírico integrado están mediadas por proteínas de la célula huésped. Se generan transcripciones de corte y empalme variadas. En el caso de los retrovirus humanos, las proteínas víricas HIV-1/2 y HTLV-I / II también se usan para regular la expresión génica. La interacción entre los factores celulares y víricos es un factor en el control de la latencia del virus y la secuencia temporal en que se expresan los genes víricos.

Los retrovirus pueden transmitirse horizontal y verticalmente. La transmisión infecciosa eficiente de retrovirus requiere la expresión en la célula diana de receptores que reconocen específicamente las proteínas de la envoltura de virus, aunque los virus pueden usar rutas de entrada no específicas, independientes del receptor, con baja eficiencia. Además, el tipo de célula diana debe ser capaz de soportar todas las etapas del ciclo de replicación después de que el virus se ha unido y ha penetrado. La transmisión vertical se produce cuando el genoma del virus se integra en la línea germinal del huésped. A continuación, el provirus es transmitido de generación en generación como si fuera un gen celular. Por lo tanto, se establecen provirus endógenos que frecuentemente están latentes, pero que pueden activarse cuando el huésped se expone a los agentes adecuados.

Como se ha mencionado anteriormente, el intermedio de ADN integrado se denomina provirus. La terapia génica previa o los sistemas de liberación de genes utilizan métodos y retrovirus que requieren la transcripción del provirus y el ensamblaje en virus infecciosos cuando están en presencia de un virus auxiliar apropiado o en una línea celular que contiene secuencias apropiadas que permiten la encapsidación sin producción coincidente de un virus auxiliar contaminante. Como se describe más adelante, no se requiere un virus auxiliar para la producción del retrovirus recombinante de la divulgación, puesto que las secuencias para la encapsidación se proporcionan en el genoma, proporcionando de este modo un vector retroviral competente para la replicación para la liberación o terapia génicas.

El genoma retroviral y el ADN proviral de la divulgación tienen al menos tres genes: *gag*, *pol* y *env*, estos genes pueden estar flanqueados por una o dos repeticiones terminales largas (LTR), o en el provirus están flanqueadas por dos repeticiones terminales largas (LTR) y secuencias que contienen secuencias que actúan en cis, tales como *psi*. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales internas (de la matriz, la cápside y la nucleocápside); el gen *pol* codifica las proteínas ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), proteasa e integrasa; y el gen *env* codifica las glicoproteínas de la envoltura viral. Las LTR en 5' y/o 3' controlan la transcripción y la poliadenilación de los ARN de los viriones. La LTR contiene todas las demás secuencias de acción en cis necesarias para la replicación del virus. Los lentivirus tienen genes adicionales que incluyen *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef* y *vpx* (en VIH-1, HIV-2 y / o SIV).

Adyacente a la LTR en 5' se encuentran secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador en ARNt) y para la encapsidación eficaz del ARN del virus en partículas (el sitio *Psi*). Si las secuencias necesarias para la encapsidación (o empaquetamiento del ARN del retrovirus en el virión infeccioso) no están en el genoma viral, el resultado es un defecto cis que evita la encapsidación del ARN vírico genómico. Este tipo de vector modificado es lo que se ha usado típicamente en los sistemas de liberación génica anteriores (es decir, sistemas que carecen de elementos que son necesarios para la encapsidación del virión).

En una primera realización, la divulgación proporciona un retrovirus recombinante capaz de infectar un gen que no está en división, una célula en división o una célula que tiene un trastorno proliferativo celular. El retrovirus recombinante competente para la replicación de la divulgación comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una GAG vírica, una POL vírica, una ENV vírica y un polinucleótido heterólogo que se expresa después de

que el vector vírico infecta una célula diana, encapsulada dentro de un virión.

En una realización, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está precedida por un promotor y está unida operablemente al promotor.

5 En otra realización, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está precedida por un sitio interno de entrada al ribosoma interno (IRES) y está operativamente unida a los IRES.

Un sitio internos de entrada al ribosoma ("IRES") se refiere a un segmento de ácido nucleico que estimula la entrada o retención de un ribosoma durante la traducción de una secuencia de codificación normalmente en 3' del IRES. En algunas realizaciones, el IRES puede comprender un sitio donante/aceptor de corte y empalme, sin embargo, los IRES preferidos carecen de un sitio donante/aceptor de corte y empalme. Normalmente, la entrada de los ribosomas en el ARN mensajero tiene lugar a través de la tapa situada en el extremo 5' de todos los ARNm eucarióticos. Sin embargo, hay excepciones a esta regla universal. La ausencia de una tapa en algunos ARNm víricos sugiere la existencia de estructuras alternativas que permiten la entrada de ribosomas en un sitio interno de estos ARN. Hasta la fecha, se ha identificado una serie de estas estructuras, denominadas IRES por su función, en la región no codificante 5' de los ARNm del virus no protegidos, tales como, en particular, los picornavirus, tales como el virus de la poliomielitis (Pelletier et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103-1112) y el virus EMCV (virus de la encefalomiocarditis (Jang et al., J. Virol., 1988, 62, 2636-2643). La divulgación proporciona el uso de un IRES en el contexto de un vector de retrovirus competente para la replicación.

20 Dependiendo del uso pretendido del vector de retrovirus de la divulgación, cualquier número de secuencias polinucleotídicas o de ácidos nucleicos heterólogas se pueden insertar en el vector de retrovirus. Algunos ejemplos se dan en el documento WO2010/036986. Por ejemplo, para los estudios *in vitro* usados habitualmente se pueden usar genes marcadores o genes indicadores, incluyendo resistencia a antibióticos y moléculas fluorescentes (por ejemplo, GFP). Las secuencias polinucleotídicas adicionales que codifican cualquier secuencia polipeptídica deseada también se pueden insertar en el vector de la divulgación. Cuando se busca la liberación *in vivo* de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, pueden usarse secuencias tanto terapéuticas como no terapéuticas. Por ejemplo, la secuencia heteróloga puede codificar una molécula terapéutica, que incluye moléculas antisentido o ribozimas dirigidas a un gen particular asociado con un trastorno proliferativo celular, la secuencia heteróloga puede ser un gen suicida (por ejemplo, HSV-tk o PNP o citosina desaminasa), un ARN de interferencia pequeño o micro-ARN, un factor de crecimiento o una proteína terapéutica (por ejemplo, Factor IX). Otras proteínas terapéuticas aplicables a la divulgación se identifican fácilmente en la materia.

35 En una realización, el polinucleótido heterólogo dentro del vector comprende una citosina desaminasa que se ha optimizado para la expresión en una célula humana. En una realización adicional, la citosina desaminasa comprende una secuencia que se ha optimizado para codones humanos y comprende mutaciones que aumentan la estabilidad de la citosina desaminasa (por ejemplo, degradación reducida o estabilidad térmica aumentada) en comparación con una citosina desaminasa de tipo silvestre. En aún otra realización, el polinucleótido heterólogo codifica una construcción de fusión que comprende una citosina desaminasa (optimizada para codones humanos o no optimizada, mutada o no mutada) unida operablemente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de UPRT u OPRT. En otra realización, el polinucleótido heterólogo comprende un polinucleótido CD de la divulgación (por ejemplo, SEQ ID NO: 3, 5, 11, 13, 15, o 17).

45 En otra realización, el vector de retrovirus competente para la replicación puede comprender un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que comprende una citosina desaminasa (como se describe en el presente documento) y puede comprender además un polinucleótido que comprende una molécula de miARN o ARN<sub>i</sub> unida a un promotor específico de tejido o de tipo celular.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "interferencia de ARN" (ARN<sub>i</sub>) se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia mediado por ácidos nucleicos de interferencia cortos (ARN<sub>i</sub>). La expresión "agente capaz de mediar en la interferencia de ARN" se refiere a ARN<sub>i</sub>, así como a vectores de ADN y ARN que codifican ARN<sub>i</sub> cuando se transcriben dentro de una célula. Como se usa en el presente documento, el término "ARN<sub>i</sub>" se refiere a ácido nucleico de interferencia corto. Con el término se pretende abarcar cualquier molécula de ácido nucleico que sea capaz de mediar en la interferencia de ARN específica de secuencia, por ejemplo ARN de interferencia corto (ARN<sub>i</sub>), ARN de doble cadena (ARN<sub>bc</sub>), microARN (miARN), ARN de horquilla corto (ARN<sub>hc</sub>), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARN<sub>i</sub> modificado químicamente, ARN silenciador de genes postranscripcional (ARN<sub>sgpt</sub>) y otros.

60 El intervalo adecuado para diseñar longitudes del tallo de un dúplex en horquilla incluye longitudes del tallo de 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos y 600-700 nucleótidos. El intervalo adecuado para diseñar longitudes dl bucle de un dúplex en horquilla incluye longitudes del bucle de 4-25 nucleótidos, 25-50 nucleótidos, o más si la longitud del tallo del dúplex de la horquilla es sustancial. En cierto contexto, las estructuras en horquilla con regiones dúplex que son más largas de 21 nucleótidos pueden estimular el silenciamiento dirigido por ARN<sub>i</sub> eficaz, con independencia de la secuencia del bucle y la longitud.

Los retrovirus replicantes de la divulgación también pueden usarse para modificar la enfermedad mediante la expresión de ARNic o miARN modificado por ingeniería genética (Dennis, Nature, 418: 122 2002) que apaga o disminuye la expresión de genes clave que gobiernan la proliferación o la supervivencia de células enfermas, incluyendo células tumorales. Dichas dianas incluyen genes como Rad 51, una enzima central en la reparación del ADN y sin la cual el crecimiento celular se restringe drásticamente. Otras dianas incluyen muchas de las moléculas de la vía de señalización que controlan el crecimiento celular (Marquez y McCaffrey Hum Gene Ther. 19:27 2008). Los vectores se replicarán a través del huésped y antes de que se produzca la inhibición del crecimiento, el virus se integra primero en el genoma del huésped y continúa haciendo que el virus después del crecimiento de esa célula se inhiba. Los métodos para seleccionar secuencias funcionales de miARN o ARNic son conocidos en la técnica. Es una característica clave en general en el diseño eficaz de secuencias de ARNic o miARN eficaces es, generalmente, evitando los efectos "fuera de la diana". Sin embargo, para el uso de vectores de replicación que son altamente específicos de las células tumorales, tales como las de la divulgación, estos efectos secundarios no son muy importantes, ya que se espera que, en último término, las células mueran. El vector de esta divulgación se haría usando células de otras especies para las que la proteína correspondiente no está significativamente dirigida. Dichas células incluyen líneas celulares de perro o líneas celulares de pollo. Como alternativa, el virus se produce mediante transfección transitoria en células derivadas de 293 humanas u otra línea celular que permite una transfección transitoria eficiente. Para este uso, el virus no necesita expresar un IRES y la secuencia de ARNic o miran simplemente puede insertarse en un sitio conveniente en el genoma del virus. Este sitio incluye la región aguas abajo de la envoltura y aguas arriba de la 3'LTR del retrovirus de replicación. Como alternativa, se pueden insertar unidades de transcripción de polIII en el genoma del virus con los ARNic o miARN apropiados, preferiblemente aguas abajo del gen de la envoltura en 3'. Pueden insertarse diferentes secuencias de ARNic o miARN para asegurar una regulación por disminución eficiente del gen diana o la regulación por disminución de más de un gen. Se pueden obtener secuencias y dianas adecuadas a partir de fuentes conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo:

- La base de datos de ARNic de MIT/ICBP <http://web.mit.edu/sirna/> - "The MIT [Massachusetts Institute of Technology]/ICBP [Integrative Cancer Biology Program] siRNA Database es un esfuerzo realizado a nivel universitario para catalogar estos reactivos validarse de forma experimental y poner la información a disposición de otros investigadores, tanto dentro como fuera de la comunidad del MIT. (Massachusetts Institute of Technology).
- Recursos de RNAi Central - [http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi\\_web/scripts/main2.pl](http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi_web/scripts/main2.pl) RNAi, incluyendo herramientas de diseño de ARNic o ARNhc. (Hannon Lab, Cold Spring Harbor Laboratory)
- La web de ARNi, <http://www.rnaiweb.com/> General resource.
- El programa de diseño de ARNic específico de dianas siDIRECT - <http://genomics.jp/sidirect/> Online target-specific para interferencia de ARN de mamífero. (Universidad de Tokio, Japón).
- Base de datos de ARNic – Una exhaustiva base de datos de ARNic que contiene dianas de ARNic contra todas las secuencias de ARNm conocidas a lo largo de diversos organismos. (Parte del sitio web de biología de los sistemas de Protein Lounge).
- Base de datos de ARNic y recursos para estudios de interferencia de ARN <http://www.mainterference.org/>
- Selector de ARNic, <http://bioinfo.wistar.upenn.edu/siRNA/siRNA.htm>. Se usó un conjunto de normas para evaluar la funcionalidad del ARNic en base a los parámetros termodinámicos (Khvorova *et al.*, 2003, Schwarz *et al.*, 2003) y determinantes relacionados con la secuencia desarrollados por Dharmacon (Reynolds *et al.*, 2004). La especificidad se determina usando BLAST contra las bases de datos UniGene. (Wistar Institute)
- Buscador de dianas de ARNic [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) (Ambion)

Los retrovirus de replicación de la divulgación también pueden expresar dianas para ARNic de origen natural que están restringidos en cuando a la expresión a tipos celulares concretos, de modo que la replicación del vector se inhibe significativamente en dichos tipos de células. Para fines antitumorales, algunas células normales en el cuerpo que se replican de forma natural en algún nivel son células hematopoyéticas, células del revestimiento del intestino y algunas células endoteliales. Estos son entonces sitios potenciales donde el virus que está en la circulación podría infectar productivamente. En general esto sería indeseable. Cualquier infección dispersa de células como estas puede inhibirse mediante la inclusión de una diana para ARNic de origen natural o una combinación de ARNic en estos tipos de células. Ya se ha demostrado alguna viabilidad del uso de dianas de ARNic para suprimir las respuestas inmunitarias. (Brown *et al.* Nat Biotechnol. 2007 25:1457-67). Estas dianas son pequeñas secuencias de ARN con una coincidencia homóloga con las secuencias de ARNic que se producen de forma natural. Estas secuencias pueden insertarse en cualquier sitio conveniente en los vectores de la presente invención sin, en general, una consecuencia perjudicial significativa para la viabilidad del vector, que no sea en una célula del tipo deseado. Los vectores se pueden fabricar y utilizar como se ha descrito anteriormente. La diana del ARNic puede insertarse en 3' del transgén pero antes de la 3'LTR o aguas arriba del IRES, pero después del extremo 3' de la envoltura. En general, la diana no se insertaría en las secuencias de codificación de proteínas.

En otras realizaciones adicionales, el polinucleótido heterólogo puede comprender una citocina, tal como una interleucina, interferón gamma o similar.

Generalmente, el virus recombinante de la divulgación es capaz de transferir una secuencia de ácido nucleico a una

célula diana.

La expresión "dominio regulador de ácido nucleico" se refiere colectivamente a secuencias promotoras (por ejemplo, secuencias promotoras de *pol* II), señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores aguas arriba, orígenes de replicación, potenciadores y similares, que colectivamente proporcionan la replicación, transcripción y traducción de una secuencia de codificación una célula receptora. No todas estas secuencias de control deben estar siempre presentes, con la condición de que la secuencia de codificación seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente la secuencia de ácido nucleico reguladora a partir de bases de datos y materiales públicos. Adicionalmente, un experto en la técnica puede identificar una secuencia reguladora que sea aplicable para el uso pretendido, por ejemplo, *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

La expresión "región promotora" se utiliza en el presente documento en su sentido habitual para hacer referencia a una región nucleotídica que comprende una secuencia reguladora de ADN, donde la secuencia reguladora deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). La secuencia reguladora puede ser homóloga o heteróloga de la secuencia génica deseada. Por ejemplo, se puede utilizar una amplia gama de promotores, incluyendo promotores de virus o de mamífero, como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga está típicamente bajo el control de las señales promotoras-potenciadoras de LTR del virus o un promotor interno y señales retenidas dentro de la LTR del retrovirus todavía puede dar lugar a una integración eficiente del vector en el genoma de la célula huésped. Por consiguiente, los vectores de retrovirus recombinantes de la divulgación, las secuencias, genes y / o fragmentos génicos deseados pueden insertarse en varios sitios y bajo diferentes secuencias reguladoras. Por ejemplo, un sitio para la inserción puede ser el sitio proximal del promotor / potenciador del virus (es decir, el locus del gen dirigido por LTR 5'). Como alternativa, las secuencias deseadas pueden insertarse en un sitio distal de la secuencia reguladora (por ejemplo, la secuencia IRES en 3' del gen *env*) o cuando hay dos o más secuencias heterólogas presentes, una secuencia heteróloga puede estar bajo el control de una primera región reguladora y una segunda secuencia heteróloga bajo el control de una segunda región reguladora. Otros sitios distales incluyen secuencias promotoras del virus, donde la expresión de la secuencia o secuencias deseadas es mediante corte y empalme del cistron proximal del promotor, se puede usar un promotor heterólogo interno como SV40 o CMV, o un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

En una realización, el genoma del retrovirus de la divulgación contiene un IRES que comprende un sitio de clonación para la inserción de una secuencia polinucleotídica deseada. En una realización, el IRES se localiza en 3' del gen *env* en el vector del retrovirus, pero en 5' del ácido nucleico heterólogo deseado. De acuerdo con esto, una secuencia polinucleotídica heteróloga que codifica un polipéptido deseado puede estar operativamente unida al IRES.

En otra realización, se incluye una secuencia polinucleotídica de direccionamiento como parte del vector de retrovirus recombinante de la divulgación. La secuencia polinucleotídica dirigida es un ligando dirigido (por ejemplo, hormonas peptídicas, tales como heregulina, anticuerpos de cadena sencilla, un receptor o un ligando para un receptor), un elemento regulador específico de tejido o específico de tipo celular (por ejemplo, un promotor o potenciador específico de tejido o específico de tipo de célula), o una combinación de un ligando dirigido y un elemento regulador específico de tejido/específico de tipo celular. Preferiblemente, el ligando dirigido está unido operativamente a la proteína *env* del retrovirus, creando una proteína *env* retroviral quimérica. Las proteínas GAG vírica, POL vírica y ENV vírica pueden derivar de cualquier retrovirus adecuado (por ejemplo, derivado de MLV o de lentivirus). En otra realización, la proteína ENV vírica no deriva de retrovirus (por ejemplo, alfavirus, CMV o VSV).

El retrovirus recombinante de la divulgación está, por lo tanto, genéticamente modificado de tal manera que el virus está dirigido a un tipo de célula particular (por ejemplo, células de músculo liso, células hepáticas, células renales, fibroblastos, queratinocitos, células madre mesenquimatosas, células de médula ósea, condrocitos, células epiteliales, células intestinales, células neoplásicas, células de glioma, células neuronales y otras conocidas en la técnica), de forma que el genoma de ácido nucleico se libera a una diana que no está en división, una célula diana en división o a una célula diana que tiene un trastorno proliferativo celular. El direccionamiento se puede lograr de dos maneras. La primera forma dirige el retrovirus a una célula diana mediante la unión a células que tienen una molécula sobre la superficie externa de la célula. Este método de dirigir el retrovirus utiliza la expresión de un ligando dirigido sobre la capa del retrovirus para ayudar a dirigir el virus a células o tejidos que tienen un receptor o molécula de unión que interacciona con el ligando dirigido sobre la superficie del retrovirus. Después de la infección de una célula por el virus, el virus inyecta su ácido nucleico en la célula y el material genético del retrovirus puede integrarse en el genoma de la célula huésped. El segundo método de dirigir utiliza elementos reguladores específicos de células o de tejidos para estimular la expresión y la transcripción del genoma viral en una célula diana que utiliza activamente los elementos reguladores, como se describe con mayor detalle a continuación. A continuación, el material genético de retrovirus transferido se transcribe y se traduce en proteínas dentro de la célula huésped. El elemento regulador dirigido está típicamente unido a la LTR en 5' y / o 3', creando una LTRB quimérica.

Mediante la inserción de una secuencia heteróloga de ácido nucleico de interés en el vector viral de la divulgación,

junto con otro gen que codifica, por ejemplo, el ligando de un receptor sobre una célula diana específica, el vector es ahora específico de la diana. Los vectores víricos pueden hacerse específicos de la diana a través de la unión de, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento se puede lograr usando un anticuerpo para dirigir el vector viral. Los expertos en la técnica conocerán, o pueden determinar fácilmente, secuencias de polinucleótidos específicos que pueden insertarse en el genoma del virus o proteínas que se pueden unir a una envoltura vírica para permitir la liberación específica de la diana del vector vírico que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés.

De este modo, la divulgación incluye, en una realización, una proteína env quimérica que comprende una proteína env del retrovirus unida operativamente a un polipéptido dirigido. El polipéptido de orientación puede ser una molécula receptora específica de célula, un ligando para un receptor específico de célula, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para un epítipo antigénico específico de célula o cualquier otro ligando fácilmente identificado en la técnica que sea capaz de unirse o interactuar con una célula diana. Entre los ejemplos de polipéptidos o moléculas dirigidos se incluyen anticuerpos bivalentes usando biotina-estreptavidina como enlazadores (Etienne-Julan et al., *J. Of General Virol.*, 73, 3251-3255 (1992); Roux et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86, 9079-9083 (1989)), virus recombinante que contiene en su envoltura una secuencia que codifica una región variable del anticuerpo monocatenario contra un hapteno (Russell et al., *Nucleic Acids Research*, 21, 1081-1085 (1993)), clonación de ligandos de hormonas peptídicas en la envoltura del retrovirus (Kasahara et al., *Science*, 266, 1373-1376 (1994)), construcciones quiméricas EPO/env (Kasahara et al., 1994), anticuerpo monocatenario contra el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la envoltura del MLV ecotrópico, lo que da lugar a una infección específica de células HeLa que expresan el receptor de LDL (Somia et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 7570-7574 (1995)), de forma similar, la gama de huéspedes del ALV se puede alterar mediante la incorporación de un ligando de integrina, lo que permite al virus cruzar la barrera de las especies para infectar específicamente células de glioblastoma de rata (Valesia-Wittmann et al., *J. Virol.* 68, 4609-4619 (1994)), y Dornberg y colaboradores (Chu y Dornberg, *J. Virol* 69, 2659-2663 (1995)) han comunicado el direccionamiento específico de tejido del virus de necrosis del bazo (SNV), un retrovirus aviar, usando envolturas que contienen anticuerpos monocatenarios contra marcadores tumorales.

La divulgación proporciona un método de producción de un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula diana, que comprende transfectar una célula huésped adecuada con lo siguiente: un vector que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una *gag* vírica, una *pol* vírica y una *env* vírica, donde el vector contiene un sitio de clonación para la introducción de un gen heterólogo, operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico reguladora, y la recuperación del virus recombinante.

El retrovirus y los métodos de la divulgación proporcionan un retrovirus competente para la replicación que no requiere virus auxiliar ni secuencia de ácido nucleico o proteínas adicionales para propagar y producir viriones. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación codifican, por ejemplo, un antígeno específico de grupo y transcriptasa inversa, (e integrasa y enzimas proteasas necesarias para la maduración y la transcripción inversa), respectivamente, como se ha tratado anteriormente. Las *gag* y *pol* víricas pueden derivar de un lentivirus, tal como VIH o un gammaretrovirus tal como MoMLV. Además, el genoma de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación incluye una secuencia que codifica una proteína de la envoltura del virus (ENV). El gen *env* puede derivar de cualquier retrovirus. La proteína env puede ser una proteína anfotrópica de la envoltura que permite la transducción de células de seres humanos y de otras especies, una proteína ecotrópica de la envoltura, que es capaz de transducir solo células de ratón y de rata, una envoltura xenotrópica, una envoltura GALV, una envoltura RD114, una envoltura de FeLV u otra envoltura de retrovirus. La envoltura también puede ser una envoltura de una fuente heteróloga, tal como un alfavirus, CMV o VSV. Además, puede ser deseable dirigir el virus recombinante mediante la unión de la proteína de la envoltura con un anticuerpo o un ligando en particular dirigido a un receptor de un tipo celular en particular. Como se ha mencionado anteriormente, los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana mediante la inserción de, por ejemplo, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento se logra a menudo usando un anticuerpo para dirigir el vector retroviral a un antígeno en un tipo de célula en particular (por ejemplo, un tipo celular encontrado en un cierto tejido, o un tipo de célula cancerosa). Los expertos en la técnica conocerán, o pueden determinar fácilmente sin experimentación excesiva, métodos específicos para lograr la liberación de un vector retroviral a un objetivo específico. En otra realización, el gen *env* no deriva de un retrovirus (por ejemplo, alfavirus, CMV o VSV). Entre los ejemplos de genes *env* derivados de retrovirus se incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). También pueden usarse otros genes *env*, tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (proteína G), la envoltura de citomegalovirus (CMV) o la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe.

En una realización, el genoma retroviral deriva de un gammaretrovirus y, más particularmente, un gammaretrovirus de mamífero. Por "derivado" se entiende que la secuencia polinucleotídica parental es un gammaretrovirus de tipo salvaje que se ha modificado mediante inserción o eliminación de secuencias de origen natural (por ejemplo, inserción de un IRES, inserción de un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido o ácido nucleico inhibidor de interés, mezcla de un promotor más eficaz de un retrovirus o virus diferente en lugar del promotor de tipo salvaje y similares).

A diferencia de los retrovirus recombinantes producidos por métodos estándar en la técnica que son defectuosos y requieren ayuda para producir partículas de vectores infecciosas, la divulgación proporciona un retrovirus que es competente para la replicación.

5 En otra realización, la divulgación proporciona vectores retrovirales que son dirigidos usando secuencias reguladoras. Se pueden utilizar secuencias reguladoras específicas de células o tejidos (por ejemplo, promotores) para dirigir la expresión de secuencias génicas en poblaciones de células específicas. Los promotores de mamífero y víricos adecuados para la divulgación se describen en otra parte del presente documento. Por consiguiente, en una realización, la divulgación proporciona un retrovirus que tiene elementos promotores específicos de tejido en el extremo 5 'del genoma retroviral. Preferiblemente, los elementos / secuencias reguladoras específicas de tejido están en la región U3 de la LTR del genoma retroviral, incluyendo, por ejemplo, promotores y potenciadores específicos de células o tejidos a células neoplásicas (por ejemplo, potenciadores y promotores específicos de células tumorales) y promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclina).

10 15 Las secuencias de control de la transcripción de la divulgación también pueden incluir secuencias de control de la transcripción de origen natural asociadas de forma natural con un gen que codifica un superantígeno, una citocina o una quimiocina.

20 En algunas circunstancias, puede ser deseable regular la expresión. Por ejemplo, se pueden utilizar diferentes promotores del virus con intensidades variables de actividad, dependiendo del nivel de expresión deseado. En células de mamífero, el promotor temprano inmediato de CMV se utiliza a menudo para proporcionar una fuerte activación de transcripción. También se han utilizado versiones modificadas del promotor de CMV que son menos potentes cuando se desean niveles reducidos de expresión del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas, se usan a menudo promotores retrovirales tales como las LTR de VLM o VTMM. Otros promotores virales que pueden usarse incluyen SV40, LTR de VRS, LTR de VIH-1 y VIH-2, promotores de adenovirus tales como de la región E1A, E2A o MLP, LTR de VAA, virus del mosaico de coliflor, VHS-TK y virus de sarcoma aviar.

30 De manera similar, pueden usarse promotores selectivos o específicos de tejidos para efectuar la transcripción en tejidos específicos o células de modo que se reduzca la toxicidad potencial o los efectos no deseados a tejidos no seleccionados como diana. Por ejemplo, pueden usarse promotores tales como el PSA, probasina, fosfatasa de ácido prostático o calicreína glandular específica de la próstata (hK2), para dirigir la expresión génica en la próstata. Otros promotores/dominios reguladores que se pueden usar se exponen en la Tabla 1.

35 En ciertas indicaciones, puede ser deseable activar la transcripción en momentos específicos tras la administración del vector de terapia génica. Esto puede hacerse con promotores tales como aquéllos que son regulables por hormonas o citocinas. Por ejemplo, en las aplicaciones de terapia génica donde la indicación es un tejido gonadal donde se producen o al que se envían esteroides específicos, puede ser ventajoso el uso de promotores regulados por andrógenos o estrógenos. Tales promotores que son regulables por hormonas incluyen VTMM, MT-1, ecdisona y RuBisco. Se pueden usar otros promotores regulados por hormonas tales como aquellos que responden a hormonas tiroideas, hipofisarias y suprarrenales. Los promotores que responden a citocinas y proteínas inflamatorias que pueden usarse, incluyen cininógeno K y T (Kageyama *et al.*, 1987), c-fos, TNF-alfa, proteína reactiva C (Arcone *et al.*, 1988), haptoglobina (Oliviero *et al.*, 1987), suero amiloide A2, C/EBP alfa, IL-1, IL-6 (Poli y Cortese, 1989), complemento C3 (Wilson *et al.*, 1990), IL-8, alfa-1 glicoproteína ácida (Prowse y Baumann, 1988), alfa-1 antitripsina, lipoproteína lipasa (Zechner *et al.*, 1998), angiotensinógeno (Ron *et al.*, 1991), fibrinógeno, c-jun (inducible por ésteres de forbol, TNF-alfa, radiación UV, ácido retinoico y peróxido de hidrógeno), colagenasa (inducida por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (inducible por glucocorticoide y metales pesados), estromelina (inducible por éster de forbol, interleucina-1 y EGF), alfa-2-macroglobulina y alfa-1-antiquimotripsina. También pueden usarse promotores específicos de tumores, tales como osteocalcina, elemento respondedor a la hipoxia (HRE), MAGE-4, ACE, alfa-fetoproteína, GRP78/BiP y tirosinasa, para regular la expresión génica en células tumorales.

50 Además, esta lista de promotores no debe interpretarse como que es exhaustiva o limitante, los expertos en la técnica conocerán otros promotores que pueden usarse junto con los promotores y métodos dados a conocer en el presente documento.

**TABLA 1 PROMOTORES ESPECÍFICOS DE TEJIDO**

| Tejido              | Promotor   |
|---------------------|--|
| Páncreas            | Insulina Elastina Amilasa pdr-1 pdx-1 glucoquinasa   |
| Hígado              | Albúmina PEPCK potenciador de HBV $\alpha$ fetoproteína apolipoproteína C $\alpha$ -1 antitripsina vitelogenina, NF-AB Transtiretina |
| Músculo esquelético | Cadena H de miosina creatina quinasa de músculo Distrofina calpaína p94 $\alpha$ -actina esquelética troponina 1 rápida              |
| Piel                | Queratina K6 Queratina K1  |

|                |   |
|----------------|---|
| Tejido         | Promotor  |
| Pulmón         | CFTR Citoqueratina humana 18 (K18) Proteínas tensioactivas pulmonares A, B y C CC-10 P1   |
| Músculo liso   | sm22 $\alpha$ SM-alfa-actina  |
| Endotelio      | Endotelina-1 E-selectina factor de von Willebrand TIE (Korhonen et al., 1995) KDR / flk-1 tirosinasa de melanocitos   |
| Tejido adiposo | Lipoproteína lipasa (Zechner et al., 1988) Adiposina (Spiegelman et al., 1989) acetil-CoA carboxilasa (Pape y Kim, 1989) glicerofosfato deshidrogenasa (Dani et al., 1989) adipocito P2 (Hunt et al., 1986) |
| Sangre         | $\beta$ -globina  |
| Glioma         | GFAP, nestina, Msi 1 (J. Huang et al. Acta Biochim Biophys Sin 2010, 42: 274-280)   |

Los "elementos reguladores específicos de los tejidos" son elementos reguladores (por ejemplo, promotores) que son capaces de dirigir la transcripción de un gen en un tejido mientras permanece en gran parte "silencioso" en otros. Se entenderá, sin embargo, que los promotores específicos de tejidos pueden tener una cantidad detectable de actividad "de fondo" o "base" en los tejidos donde son silenciosos. El grado en el que un promotor se activa selectivamente en un tejido diana se puede expresar como una relación de selectividad (actividad en un tejido / actividad diana en un tejido de control). A este respecto, un promotor específico de tejido útil en la práctica de la divulgación tiene típicamente una relación de selectividad mayor de aproximadamente 5. Preferiblemente, la relación de selectividad es mayor que aproximadamente 15.

Se entenderá además que ciertos promotores, aunque no están restringidos en actividad a un solo tipo de tejido, puede mostrar, sin embargo, selectividad en cuanto a que pueden ser activos en un grupo de tejidos y menos activos o silenciosos en otro grupo. Tales promotores se denominan también "específicos de tejido" y se contemplan para su uso con la divulgación. Por ejemplo, los promotores que son activos en una diversidad de neuronas del sistema nervioso central (SNC) pueden ser terapéuticamente útiles en la protección contra el daño debido a accidentes cerebrovasculares, que puede afectar a cualquiera de varias regiones diferentes del cerebro. De acuerdo con ello, los elementos reguladores específicos de tejido utilizados en la divulgación tienen aplicabilidad a la regulación de las proteínas heterólogas, así como una aplicabilidad como una secuencia polinucleotídica diana en los presentes vectores retrovirales.

Los vectores retrovirales y el polinucleótido CD y el polipéptido de la divulgación pueden usarse para tratar una amplia gama de enfermedades y trastornos que incluyen una serie de enfermedades y trastornos proliferativos de células (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 4.405.712 y 4.650.764; Friedmann, 1989, Science, 244:1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260:926-932, R. Crystal, 1995, Science 270:404-410, véase también, The Development of Human Gene Therapy, Theodore Friedmann, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. ISBN 0-87969-528-5.

La frase célula "que no se divide" se refiere a una célula que no pasa por mitosis. Las células que no se dividen pueden estar bloqueadas en cualquier punto del ciclo celular (por ejemplo, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/X), siempre que la célula no se esté dividiendo de forma activa. Para la infección *ex vivo*, una célula en división se puede tratar para bloquear la división celular mediante técnicas estándar utilizadas por los expertos en la técnica, incluyendo irradiación, tratamiento con afidocolina, inanición de suero e inhibición de contacto. Sin embargo, debe entenderse que la infección *ex vivo* se realiza a menudo sin bloquear las células, ya que muchas células ya están detenidas (por ejemplo, células madre). Por ejemplo, un vector lentivirus recombinante es capaz de infectar muchas células que no se dividen, independientemente del mecanismo usado para bloquear la división celular o el punto en el ciclo celular donde la célula está bloqueada. Entre los ejemplos de células preexistentes que no se dividen en el cuerpo se incluyen células neuronales, musculares, hepáticas, de piel, de corazón, de pulmón y de médula ósea, y sus derivados. Para las células en división pueden usarse vectores gamma-retrovirales, ya que solo son capaces de infectar células que se están dividiendo.

Por célula "en división" se entiende una célula que experimenta mitosis activa, o meiosis. Tales células de división incluyen células madre, células de la piel (por ejemplo, fibroblastos y queratinocitos), gametos y otras células en división conocidas en la técnica. De interés particular y abarcadas por el término célula en división son células que tienen trastornos proliferativos celulares, tales como células neoplásicas. El término "trastorno proliferativo celular" se refiere a una afección caracterizada por un número anormal de células. La afección puede incluir tanto el crecimiento celular hipertrófico (la multiplicación continua de células que da como resultado un crecimiento excesivo de una población de células dentro de un tejido) como hipotrófico (falta o deficiencia de células dentro de un tejido) o un exceso de afluencia o migración de células hacia un área de un cuerpo. Las poblaciones celulares no son necesariamente células transformadas, tumorigénicas o malignas, sino que también pueden incluir células normales. Los trastornos proliferativos de las células incluyen trastornos asociados con un crecimiento excesivo de tejidos conectivos, tales como diversas afecciones fibróticas, incluyendo esclerodermia, artritis y cirrosis hepática. Los trastornos proliferativos celulares incluyen trastornos neoplásicos, tales como carcinomas de cabeza y cuello. Los carcinomas de cabeza y cuello incluirían, por ejemplo, carcinoma de la boca, esófago, garganta, laringe, glándula

5 tiroides, lengua, labios, glándulas salivales, nariz, senos paranasales, nasofaringe, bóveda nasal superior y tumores sinusales, esteseoneuroblastoma, cáncer de células escamosas, melanoma maligno, carcinoma senonasal indiferenciado (CSNI), cerebro (incluyendo glioblastomas) o neoplasia sanguínea. También se incluyen los carcinomas de los ganglios linfáticos regionales, incluidos los ganglios linfáticos cervicales, los ganglios linfáticos prelaríngeos, los ganglios linfáticos yuxtaesofágicos pulmonares y los ganglios linfáticos submandibulares (Harrison's Principles of Internal Medicine (eds., Isselbacher, et al., McGraw-Hill, Inc., 13ª Edición, pág. 1850-1853, 1994). Otros tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a los mismos, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, linfoma de cáncer uterino, cáncer oral, cáncer de páncreas, leucemia, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de piel y cáncer de ovarios.

10 La divulgación también proporciona terapia génica para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares. Tal terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de una secuencia polinucleotídica terapéutica apropiada (por ejemplo, antisentido, ribozimas, genes suicidas, ARN<sub>i</sub>), en células del sujeto que tiene el trastorno proliferativo. La liberación construcciones polinucleotídicas se puede lograr utilizando el vector retroviral recombinante de la divulgación, particularmente si está basado en MLV, que será capaz de infectar solo a las células en división y que continúa haciéndolo en células infectadas, incluso después de que las células dejen de dividirse.

15 Además, los métodos terapéuticos (por ejemplo, la terapia génica o los métodos de administración génica) como se describen en el presente documento pueden realizarse *in vivo* o *ex vivo*. Puede ser preferible eliminar la mayoría de un tumor antes de la terapia génica, por ejemplo quirúrgicamente o por radiación. La cirugía o la radiación también se pueden utilizar después de la terapia génica. En algunos aspectos, la terapia retroviral puede estar precedida o seguida de quimioterapia.

20 De este modo, la divulgación proporciona un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide, una célula en división o una célula neoplásica, en ella, el retrovirus recombinante comprende una GAG del virus; una POL del virus; una ENV del virus; un ácido nucleico heterólogo unido operativamente a un IRES o a un promotor interno; y secuencias de ácido nucleico que actúan en *cis* necesarias para el empaquetamiento, la transcripción inversa y la integración. El retrovirus recombinante puede ser un lentivirus, tal como el VIH, o puede ser un gammaretrovirus. Como se ha divulgado anteriormente para el método de producción de un retrovirus recombinante, el retrovirus recombinante de la divulgación puede incluir además al menos una de las proteínas VPR, VIF, NEF, VPX, TAT, REV y VPU. Aunque no se desea estar limitado por una teoría particular, se cree que uno o más de estos genes / productos proteicos son importantes para aumentar el título viral del retrovirus recombinante producido (por ejemplo, NEF) o puede ser ventajoso para la infección y el empaquetamiento del virión en células con altos niveles de elementos de restricción vírica (por ejemplo, VIF para células con APOBEC3G activo o equivalente).

25 La divulgación también proporciona un método de transferencia de ácido nucleico a una célula diana para proporcionar la expresión de un ácido nucleico particular (por ejemplo, una secuencia heteróloga). Por lo tanto, en otra realización, la divulgación proporciona un método para la introducción y expresión de un ácido nucleico heterólogo en una célula diana que comprende infectar la célula diana con el virus recombinante de la divulgación y expresar el ácido nucleico heterólogo en la célula diana. Como se ha mencionado anteriormente, la célula diana puede ser cualquier tipo de célula, incluyendo los tipos de células en división, que no se dividen, neoplásicas, inmortalizadas, modificadas y otras reconocidas por los expertos en la técnica, siempre que sean capaces de infectarse con un retrovirus.

30 Puede ser deseable modular la expresión de un gen en una célula mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico heteróloga) mediante el método de la divulgación, donde la secuencia de ácido nucleico da lugar, por ejemplo, a una molécula antisentido o ribozima. El término "modular" prevé la supresión de la expresión de un gen cuando está sobreexpresado o el aumento de la expresión cuando está subexpresado. Cuando un trastorno proliferativo celular está asociado con la expresión de un gen, pueden usarse secuencias de ácidos nucleicos que interfieren con la expresión del gen a nivel de la traducción. Este enfoque utiliza, por ejemplo, ácido nucleico antisentido, ribozimas o agentes triplex para bloquear la transcripción o la traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o triplex, o escindiéndolo con una ribozima.

35 Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias de al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub, Scientific American, 262:40, 1990). En la célula, los ácidos nucleicos antisentido hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula bicatenaria. Los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la traducción del ARNm, ya que la célula no traducirá un ARNm que sea de doble cadena. Se prefieren oligómeros antisentido de aproximadamente 15 nucleótidos, ya que son fácilmente sintetizados y son menos propensos a causar problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en la célula diana. El uso de métodos antisentido para inhibir la traducción *in vitro* de genes es bien conocido en la técnica (Marcus-Sakura, Anal. Biochem., 172:289, 1988).

40 El ácido nucleico antisentido puede usarse para bloquear la expresión de una proteína mutante o un producto génico predominantemente activo, tal como una proteína precursora amiloide que se acumula en la enfermedad de Alzheimer. Tales métodos son también útiles para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, el parkinsonismo



hereditario y otras enfermedades. De particular interés son el bloqueo de genes asociados con trastornos proliferativos de células. Los ácidos nucleicos antisentido también son útiles para la inhibición de la expresión de proteínas asociadas con la toxicidad.

5 La utilización de un oligonucleótido para detener la transcripción se conoce como la estrategia triplex, ya que el oligómero se enrolla alrededor del ADN de doble hélice formando una hélice de tres cadenas. Por lo tanto, estos compuestos triplex pueden diseñarse para reconocer un sitio único en un gen elegido (Maher, et al., *Antisense Res. and Dev.*, 1(3):227, 1991; Helene, C., *Anticancer Drug Design*, 6(6):569, 1991).

10 Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otro ARN monocatenario de una manera análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. Mediante la modificación de las secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN, es posible diseñar moléculas que reconozcan secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindir las (Cech, *J. Amer. Med. Assn.*, 260:3030, 1988). Una ventaja importante de este enfoque es que, debido a que son específicos de secuencia, solo se inactivan los ARNm con secuencias particulares.

Puede ser deseable transferir un ácido nucleico que codifica un modificador de la respuesta biológica (por ejemplo, una citocina). Se incluyen en esta categoría agentes inmunopotenciadores que incluyen ácidos nucleicos que codifican una serie de citocinas clasificadas como "interleucinas". Estas incluyen, por ejemplo, las interleucinas 1 a 15. También se incluyen en esta categoría, aunque no necesariamente funcionan según los mismos mecanismos, los interferones y, en particular, el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM - CSF). Otros polipéptidos incluyen, por ejemplo, factores angiogénicos y factores antiangiogénicos. Puede ser deseable suministrar tales ácidos nucleicos a células de médula ósea o macrófagos para tratar deficiencias enzimáticas o defectos inmunes. Los ácidos nucleicos que codifican factores de crecimiento, péptidos tóxicos, ligandos, receptores u otras proteínas fisiológicamente importantes también se pueden introducir en células diana específicas.

Por ejemplo, HER2 (véase, por ejemplo, las SEQ ID NO: 23 y 24), un miembro de la familia del receptor de EGF, es la diana para la unión del fármaco trastuzumab (Herceptin TM, Genentech). Trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). La actividad está dirigida. Preferentemente, a células que expresan HER2 con niveles de sobreexpresión 2+ y 3+ mediante inmunohistoquímica en lugar de células 1+ y sin expresión (ficha técnica de Herceptin, Crommelin 2002). El aumento de la expresión de HER2 mediante la introducción de un vector que expresa HER2 o HER2 truncado (que expresa solo los dominios extracelular y transmembrana) en tumores bajos de HER2 puede facilitar el desencadenamiento óptimo de CCDA y superar la resistencia de desarrollo rápido a HER2 que se observa en el uso clínico.

La sustitución de yCD2 para el dominio intracelular de HER2 permite la expresión en la superficie celular de HER2 y la localización citosólica de yCD2. El dominio extracelular de HER2 (DEC) y el dominio transmembrana (TM) (aproximadamente 2026 pb desde aproximadamente la posición 175 a 2200) pueden amplificarse por PCR (Yamamoto et al., *Nature* 319:230-234, 1986; Chen et al., *Canc. Res.*, 58:1965-1971, 1998) o sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Ontario, Canadá) e insertarse entre el IRES y el gen yCD2 en el vector pAC3-yCD2 SEQ ID NO: 19. Como alternativa, el gen yCD puede ser escindido y reemplazado por un polinucleótido que codifica un polipéptido HER2 o fragmento del mismo. Se puede amplificar o sintetizar químicamente otro HER2 truncado con solo el dominio IV de unión a Herceptin de los dominios DEC y TM (aproximadamente 290 pb desde la posición 1910 a 2200) (Landgraf 2007; Garrett et al., *J. of Immunol.*, 178:7120-7131, 2007) y usar como se ha indicado anteriormente. Una modificación adicional de esta forma truncada con el péptido señal nativo (aproximadamente 69 pb desde la posición 175-237) fusionado al dominio IV y al TM puede sintetizarse químicamente y utilizarse como se ha indicado anteriormente. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

Como alternativa, HER2 y las modificaciones divulgadas anteriormente se pueden expresar en un vector separado que contiene un gen de ENV diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente para la replicación (Logg et al. *J.Mol Biol.* 369:1214 2007) o un vector retroviral no replicativo de "primera generación" que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al. *J.Virol* 65:1202 1991). En este último caso, la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENV y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum et al., *Mol. Therapy*, 13(6):1050-1063, 2006). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se suprimen los genes GAG y POL y yCD2 de la SEQ ID NO 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a HER2, HER2 ECDTM, HER2 ECDIVTM, o HER2 SECDIVTM.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por

retrovirus derivados como anteriormente da lugar a la producción de viriones de progenie capaces de codificar yCD2 y HER2 (o variante) en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

5 Otro aspecto del desarrollo de resistencia al trastuzumab se refiere a la interferencia con la señalización intracelular requerida para la actividad del trastuzumab. Las células resistentes muestran pérdida de PTEN y menor expresión de p27kip1 [Fujita, Brit J. Cancer, 94:247, 2006; Lu et al., Journal of the National Cancer Institute, 93(24): 1852-1857, 2001; Kute et al., Cytometry Part A 57A:86-93, 2004).

10 Por ejemplo, un polinucleótido que codifica PTEN (SEQ ID NO: 25) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse de forma operativa directamente después del gen yCD2 en el vector pAC3-yCD2 SEQ ID NO: 19 o 22, o con una secuencia enlazadora como se ha descrito anteriormente, o como sustituto de yCD2. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica PTEN se puede sintetizar como se ha indicado anteriormente e insertarse entre las secuencias IRES y yCD2 o con un enlazador como se ha descrito  
15 anteriormente.

Como alternativa, PTEN se puede expresar en un vector separado que contiene un gen de ENV diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente para la replicación (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral no replicativo de "primera generación" que codifica la envoltura y el gen de  
20 interés (Emi et al., J.Virol 65:1202 1991). En este último caso, la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENVI y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu, Rev Med Virol. 2000, Baum, Mol. Ther. 13(6):1050-1063, 2006). Por ejemplo,  
25 un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se suprimen los genes *gag* y *pol* y *yCD2* de la SEQ ID NO 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a PTEN.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción  
30 de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente da lugar a la producción de viriones de progenie capaces de codificar yCD2 y PTEN (o variante) o PTEN solo en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.  
35

De un modo similar, un polinucleótido que codifica p27kip1 (SEQ ID NO: 27 y 28) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse de forma operativa directamente después del gen yCD2 en el vector pAC3-yCD2 SEQ ID NO: 19 o con una secuencia enlazadora. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica  
40 p27kip1 se puede sintetizar como se ha indicado anteriormente e insertarse entre las secuencias IRES y yCD2 o con un enlazador como se ha descrito anteriormente previamente o en lugar del gen yCD2.

Como alternativa, p27kip1 se puede expresar en un vector separado que contiene un gen de *env* diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser un vector retroviral de "primera generación" competente para la replicación o no replicativo que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al. J.Virol 65:1202 1991). En este  
45 último caso, la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENVI y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum 2006, citado anteriormente). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se  
50 suprimen los genes *gag* y *pol* y *yCD2* de la SEQ ID NO: 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a p27kip1.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción  
55 de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente de la SEQ ID NO: 19 y TT da como resultado la producción de viriones de progenie capaces de codificar yCD2 y p27kip1 (o variante) en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.  
60

En otro ejemplo, CD20 es la diana para la unión del fármaco rituximab (Rituxan™, Genentech). Rituximab es un mediador de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y CCDA. Las células con mayor intensidad de fluorescencia media por citometría de flujo muestran una sensibilidad mejorada a rituximab (van Meerten et al., Clin Cancer Res 2006; 12(13):4027-4035, 2006). El aumento de la expresión de CD20 mediante la introducción de un  
65 vector que expresa CD20 en células B bajas en CD20 puede facilitar el desencadenamiento óptimo de CCDA.

Por ejemplo, un polinucleótido que codifica CD20 (SEQ ID NO: 29 y 30) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse de forma operativa directamente después del gen *yCD2* en el vector pAC3-*yCD2(-2)* SEQ ID NO: 19 o 22, o con una secuencia enlazadora como se ha descrito anteriormente, o como sustituto del gen *yCD2*. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica CD se puede sintetizar como se ha indicado anteriormente e insertarse entre las secuencias IRES y *yCD2* o con un enlazador como se ha descrito anteriormente. Como otra alternativa, la secuencia CD20 puede insertarse en el vector pAC3-*yCD2* después de la escisión del gen CD por digestión con Psi1 y Not1.

En otro ejemplo adicional, un polinucleótido que codifica CD20 (SEQ ID NO: 29 y 30) puede sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse en un vector que contiene un gen *env* no anfitriónico u otra proteína de superficie adecuada (Tedder et al., PNAS, 85:208-212, 1988). La ENV y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum 2006). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se suprimen los genes *gag* y *pol* y *yCD2* de la SEQ ID NO: 19, la ENV corresponde a un dominio de ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como RSV está unido operativamente directamente a CD20.

La infección mixta de células por virus VSVG pseudotipado y retrovirus anfitriónico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro [Emi 1991]. Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente de la SEQ ID NO: 19 o 22 da como resultado la producción de viriones de progenie capaces de codificar *yCD2* y CD20 en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con Rituxan y/o 5-FU. De forma similar, la infección de un tumor con un vector que codifica solo el marcador CD20 puede hacer que el tumor sea tratable mediante el uso de Rituxan.

Los niveles de las enzimas y cofactores implicados en el anabolismo pirimidínico pueden ser limitantes. La expresión de OPRT, timidina quinasa (TK), uridina monofosfato quinasa y pirimidina nucleósido fosforilasa es baja en las células cancerosas resistentes a 5-FU en comparación con las líneas sensibles (Wang et al., Cancer Res., 64:8167-8176, 2004). Los análisis en poblaciones grandes muestran una correlación de los niveles enzimáticos con el desenlace de la enfermedad (Fukui et al., Int'l. J. OF Mol. Med., 22:709-716, 2008). La coexpresión de CD y otras enzimas del anabolismo de las pirimidinas (PAE) puede explotarse para aumentar la actividad y, por lo tanto, el índice terapéutico de los fármacos de fluoropirimidina.

Para aumentar adicionalmente la estabilidad genética (véase, por ejemplo, la Figura 5) de vectores que contienen *yCD2* / PAE, el gen que codifica la enzima puede sintetizarse químicamente con mutaciones aleatorias a lo largo de la secuencia. Estas mutaciones pueden ser esencialmente aleatorias o pueden consistir únicamente en mutaciones en la posición de oscilación para cada aminoácido. La biblioteca de secuencias mutadas se inserta aguas abajo del gen *yCD2* tal como se ha descrito previamente para las SEQ ID NO: 11 y 13 para crear una biblioteca de plásmidos que pueda usarse entonces para generar una biblioteca de partículas infecciosas mediante transfección transitoria de células 293T o equivalentes. Las células sensibles pueden infectarse con retrovirus que codifican el polipéptido de fusión y someterse a selección con sustancias químicas apropiadas. Por ejemplo, la herpes timidina quinasa (TK) mutagenizada aleatoriamente se sintetiza químicamente (Bio Basic Inc, Markham, Canadá). La secuencia sintética se inserta en 3' de la secuencia de *yCD2* en la SEQ ID NO: 19 o por sí misma en los huecos traseros del vector pAC3-*yCD2* después de la escisión del gen CD2. La mezcla de vectores retrovirales se empaqueta como se ha descrito anteriormente. Las células LMTK de fibroblasto de ratón se infectan con el vector y se seleccionan según la actividad de TK en medio HAT (Hiller et al., Mol. Cell Biol. 8(8):3298-3302, 1988). El paso en serie de sobrenadantes de células resistentes a células LMTK- recientes seleccionadas de nuevo en medio HAT da como resultado la selección de vectores estables que expresan TK. Las células TK+ resistentes pueden aislarse y las secuencias de TK rescatarse mediante técnicas estándar basadas en PCR para el análisis de mutaciones (Cowell et al., CDNA Library Protocols, Publicado por Humana Press, 1996). De esta manera, las secuencias se seleccionan tanto para la expresión de la proteína funcional como para la estabilidad genómica de la construcción del vector retroviral. Se pueden emplear estrategias similares para la UPRT (SEQ ID NO: 11, 13), OPRT (SEQ ID NO: 15, 17) (Olah et al., Cancer Res. 40:2869-2875, 1980; y Suttle, Somatic Cell & Mol. Genet., 15(5):435-443, 1989) y otros genes de interés.

Como alternativa, OPRT, UPRT, TK u otro PAE se puede expresar en un vector separado que contiene un gen de ENV diferente u otra glicoproteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente para la replicación (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral no replicativo de "primera generación" que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al. J.Virol 65:1202 1991). En este último caso, la infección vírica preexistente proporcionará *gag* y *pol* complementarias para permitir la propagación infecciosa del vector "no replicativo" de cualquier célula previamente infectada. La ENV1 y las glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus [Palu 2000, Baum 2006, citado anteriormente]. Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia donde se delecionan los genes GAG y POL, la ENV corresponde a un dominio ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g y el IRES o un promotor tal como RSV está

operativamente unido directamente a OPRT, UPRT, TK u otro gen de PAE.

La infección mixta de células por virus VSV-g pseudotipado y retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de viriones de progenie que llevan el genoma de un virus encapsulado por las proteínas de la envoltura del otro (Emi et al., J. Virol. 65:1202, 1991). Lo mismo es cierto para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivados como anteriormente de la SEQ ID NO: 19 y 20 da como resultado la producción de viriones de progenie capaces de codificar YCD2 y OPRT en células infectadas. Los virus resultantes pueden usarse para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con 5-FU.

El retrovirus recombinante de la divulgación puede usarse para el tratamiento de un trastorno neuronal por ejemplo, puede contener, opcionalmente, un gen exógeno, por ejemplo, un gen que codifica un receptor o un gen que codifica un ligando. Tales receptores incluyen receptores que responden a dopamina, GABA, adrenalina, noradrenalina, serotonina, glutamato, acetilcolina y otros neuropéptidos, como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de ligandos que pueden proporcionar un efecto terapéutico en un trastorno neuronal incluyen dopamina, adrenalina, noradrenalina, acetilcolina, ácido gamma-aminobutírico y serotonina. La difusión y captación de un ligando requerido después de la secreción por una célula donante infectada sería beneficiosa en un trastorno donde la célula neural del sujeto es defectuosa en la producción de tal producto génico. Una célula modificada genéticamente para secretar un factor neurotrófico, tal como el factor de crecimiento nervioso, (NGF), podría utilizarse para prevenir la degeneración de neuronas colinérgicas que, de otro modo, podrían morir sin tratamiento.

Como alternativa, las células se injertan en un sujeto con un trastorno de los ganglios basales, tales como la enfermedad de Parkinson, pueden modificarse para que contengan un gen exógeno que codifica L-DOPA, el precursor de la dopamina. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del mesencéfalo, que tiene los ganglios basales como su principal órgano diana.

Otros trastornos neuronales que pueden tratarse de manera similar por el método de la divulgación incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, los daños neuronales producidos por un accidente cerebrovascular y los daños en la médula espinal. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la degeneración de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal. El neurotransmisor de estas neuronas es la acetilcolina, que es necesaria para su supervivencia. El injerto de células colinérgicas infectadas con un retrovirus recombinante de la divulgación que contiene un gen exógeno para un factor que estimularía supervivencia de estas neuronas puede conseguirse mediante el método de la divulgación, tal como se ha descrito. Después de un accidente cerebrovascular, hay pérdida selectiva de células en el CA1 del hipocampo, así como pérdida de células corticales que pueden subyacer a la pérdida de función cognitiva y de memoria en estos pacientes. Una vez identificadas, las moléculas responsables de la muerte celular CA1 pueden inhibirse mediante los métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, las secuencias antisentido o un gen que codifica un antagonista pueden transferirse a una célula neuronal e implantarse en la región hipocámpal del cerebro.

Para enfermedades debidas a la deficiencia de un producto proteico, la transferencia génica podría introducir un gen normal en los tejidos afectados para la terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para la enfermedad usando mutaciones antisentido. Por ejemplo, puede ser deseable insertar un ácido nucleico que codifica el factor IX en un retrovirus para la infección de una célula muscular o hepática.

La divulgación también proporciona terapia génica para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares o inmunológicos. Dicha terapia conseguiría su efecto terapéutico mediante la introducción de un polinucleótido antisentido, de ARNs o codificante dominante negativo en células que tienen el trastorno proliferativo, donde el polinucleótido se une y evita la traducción o la expresión de un gen asociado con un trastorno proliferativo celular. La liberación de ácidos nucleicos heterólogos útiles en el tratamiento o modulación de un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, polinucleótidos antisentido o de ARNic) se puede conseguir usando un vector retroviral recombinante de la divulgación. En otra realización, un trastorno proliferativo celular se trata introduciendo un polinucleótido CD de la divulgación, expresando el polinucleótido para producir un polipéptido que comprende actividad de citosina desaminasa y poniendo en contacto la célula con 5-fluorocitosina en una cantidad y durante un periodo de tiempo para producir una cantidad citotóxica de 5-FU.

Además, la divulgación proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica un vector retroviral recombinante de la divulgación. La secuencia polinucleotídica puede incorporarse en diversas partículas del virus. Por ejemplo, diversos vectores víricos que pueden utilizarse para la terapia génica incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia o, preferiblemente, un virus de ARN tal como un retrovirus y más particularmente un gamma retrovirus de mamífero. El vector retroviral puede ser un derivado de un retrovirus murino, simio o humano. Ejemplos de vectores retrovirales en que puede insertarse un gen extraño (por ejemplo, una secuencia polinucleotídica heteróloga) incluyen, pero no se limitan a: derivados del virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia murina Moloney (MoMuLV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), virus del sarcoma de Rous (RSV), virus de la leucemia de mono de gibón (GALV), virus endógeno del babuino (BEV) y el virus felino RD114. Todos estos vectores pueden transferir o incorporar un gen para un marcador seleccionable para que las células transducidas puedan identificarse y generarse. Mediante la inserción de una secuencia heteróloga de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica, por ejemplo, el ligando de un receptor sobre una célula diana específica, el vector es ahora específico de la

diana. Los vectores retrovirales pueden hacerse específicos de la diana a través de la unión de, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento se logra utilizando un anticuerpo o ligando para dirigirse al vector retroviral. Los expertos en la técnica sabrán, o pueden determinar fácilmente, sin experimentación indebida, secuencias polinucleóticas específicas que pueden insertarse en el genoma retroviral o fijarse a una envoltura de virus para permitir la liberación específica del vector retroviral que contiene el polinucleótido heterólogo. Además, el vector retroviral puede dirigirse a una célula utilizando un elemento regulador específico de células o tejidos contenido en la LTR del genoma retroviral. Preferiblemente, el elemento regulador específico de células o tejidos está en la región U3 de las LTR. De esta manera, después de la integración en una célula, el genoma retroviral solo se expresará en células donde el promotor específico de células o tejidos está activo.

En otra realización más, la divulgación proporciona plásmidos que comprenden una construcción derivada de retrovirus recombinante. El plásmido puede introducirse directamente en una célula diana o en un cultivo celular, tal como NIH 3T3 u otras células de cultivo de tejidos. Las células resultantes liberan el vector retroviral en el medio de cultivo.

La divulgación proporciona una construcción polinucleótida que comprende de 5' a 3': un promotor o región reguladora útil para iniciar la transcripción; una señal de empaquetamiento psi; una secuencia de ácido nucleico que codifica *gag*, una secuencia de ácido nucleico que codifica *pol*; una secuencia de ácido nucleico codificante *env*; una secuencia de ácido nucleico del sitio interno de entrada al ribosoma; un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador, polipéptido terapéutico o de diagnóstico; y una secuencia de ácido nucleico LTR. Como se ha descrito en otra parte del presente documento y como sigue, los diversos segmentos de la construcción de polinucleótido de la divulgación (por ejemplo, un polinucleótido retroviral recombinante competente para la replicación) se modifica genéticamente dependiendo, en parte, de la célula huésped deseada, del tiempo o cantidad de expresión y del polinucleótido heterólogo. Una construcción retroviral competente para la replicación de la divulgación puede dividirse en una serie de dominios que los expertos en la técnica pueden modificar individualmente.

Por ejemplo, el promotor puede comprender un promotor de CMV que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de uno o más (por ejemplo, 2-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-100 o más bases de ácido nucleico) siempre que el promotor modificado sea capaz de dirigir e iniciar la transcripción. En una realización, el promotor o región reguladora comprende un polinucleótido de dominio CMV-R-U5. El dominio CMV-R-U5 comprende el promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano a la región R-U5 de MLV. En una realización, el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos un 95 % idénticas a una secuencia tal como se ha expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22, donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la misma. El dominio *gag* del polinucleótido puede derivar de cualquier número de retrovirus, pero típicamente derivará de un gamma-retrovirus y, más particularmente, de un gamma-retrovirus de mamífero. En una realización, el dominio *gag* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 hasta aproximadamente el nucleótido 2819 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma. El dominio *pol* del polinucleótido puede derivar de cualquier número de retrovirus, pero típicamente derivará de un gamma-retrovirus y, más particularmente, de un gamma-retrovirus de mamífero. En una realización, el dominio *pol* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 hasta aproximadamente el nucleótido 6358 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma. El dominio *env* del polinucleótido puede derivar de cualquier número de retrovirus, pero típicamente derivará de un gammaretrovirus o gamma-retrovirus y, más particularmente, de un gammaretrovirus o gamma-retrovirus de mamífero. En algunas realizaciones, el dominio de codificación de *env* comprende un dominio *env* anfotrópico. En una realización, el dominio *env* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 hasta aproximadamente el nucleótido 8323 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma. El dominio IRES del polinucleótido puede obtenerse a partir de cualquier número de sitios internos de entrada al ribosoma. En una realización, el IRES deriva de un virus de encefalomiocarditis. En una realización, el dominio de IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 8327 hasta aproximadamente el nucleótido 8876 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, o 99 % (redondeada a la 10a más próxima) con la misma, siempre que el dominio permita la entrada de un ribosoma. El dominio heterólogo puede comprender una citosina desaminasa de la divulgación. En una realización, el polinucleótido CD comprende una secuencia optimizada para codones humanos. En otra realización más, el polinucleótido CD codifica un polipéptido mutante que tiene citosina desaminasa, donde las mutaciones confieren una estabilización térmica incrementada que aumenta la temperatura de fusión ( $T_m$ ) en 10 °C, permitiendo una actividad cinética sostenida en un intervalo de temperatura más amplio y mayores niveles acumulados de proteína. En una realización, la citosina desaminasa comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido número 8877 hasta aproximadamente 9353. El dominio heterólogo puede estar seguido de un dominio rico en polipurina. La LTR en 3' puede derivar de cualquier número de retrovirus, típicamente un gammaretrovirus y, preferiblemente, un gammaretrovirus de mamífero. En una realización, la LTR 3' comprende un dominio U3-R-U5. En otra realización más, la LTR comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 9405 hasta aproximadamente 9998 o una secuencia que es al menos un 95 %, 98 %

o 99,5 % (redondeada a la décima más próxima) idéntica a la misma.

La divulgación también proporciona un vector retroviral recombinante que comprende de 5' a 3' un R-U5 de CMV, fusión del promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano a la región R-U5 de MLV; un PBS, sitio de unión del cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme en 5'; una señal de empaquetamiento  $\psi$ ; un *gag*, ORF para el antígeno específico del grupo MLV; un *pol*, ORF para la poliproteína polimerasa MLV; un sitio de corte y empalme en 3'; un env 4070A, ORF para la proteína de la envoltura de la cepa 4070A de MLV; un IRES, sitio interno de entrada al ribosoma del virus de encefalomiocarditis; una citosina desaminasa modificada (termoestabilizada y optimizada por codones); un PPT, tira de polipurina; y una repetición terminal larga U3-R-U5 de MLV. Esta estructura se representa adicionalmente en la Figura 3.

La divulgación también proporciona un vector retroviral que comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22.

Un número de agentes quimioterapéuticos están actualmente en el mercado con diferentes grados de éxito desde la remisión completa a la remisión temporal y la vida prolongada con recurrencia esperada. Algunos de los agentes terapéuticos contra el cáncer en el mercado están dirigidos a las propiedades angiogénicas vasculares del tumor. La composición está dirigida a la angiogénesis de los tumores, buscando reducir la irrigación de sangre y suministro nutrientes al tumor o al cáncer y, de este modo, reducir el tumor y prolongar la vida del sujeto. El VEGF es un factor angiogénico conocido por desempeñar un papel en el crecimiento tumoral. De este modo, se han desarrollado antagonistas del VEGF como agentes anticancerosos.

El VEGF humano participa en la neoangiogénesis en la vasculatura normal y maligna; está sobreexpresado en la mayoría de las neoplasias malignas y los altos niveles se han correlacionado con un mayor riesgo de metástasis y un mal pronóstico en muchos. Cuando el VEGF interacciona con su receptor en los modelos *in vitro* de angiogénesis, se producen proliferación de células endoteliales y formación de nuevos vasos sanguíneos. En modelos animales, se ha demostrado que el VEGF induce la proliferación / migración de células endoteliales vasculares, sostiene la supervivencia de los vasos sanguíneos recién formados y aumenta la permeabilidad vascular.

Un agente antagonista de VEGF es uno que está dirigido o regula negativamente la vía de señalización del VEGF. Entre los ejemplos se incluyen inhibidores de VEGF (por ejemplo, agentes que inhiben directamente el VEGF (por ejemplo, VEGF-A, -B, -C, o -D), tal como mediante la unión de VEGF (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab (AVASTIN®) o ranibizumab (LUCENTIS®) u otros inhibidores tales como pegaptanib, NEOVASTAT®, AE-941, VEGF Trap, y PI-88)), moduladores de la expresión de VEGF (por ejemplo, INGN-241, tetratiomolibdato oral, 2-metoxiestradiol, metoxiestradiol en dispersión de nanocristales, bevasiranib sódico, PTC-299, Veglin), inhibidores de un receptor de VEGF (por ejemplo, KDR o receptor III de VEGF (Flt4), por ejemplo anticuerpos anti-KDR, anticuerpos frente a VEGFR2 tales como CDP-791, IMC-1121B, bloqueadores de VEGFR2 tales como CT-322), moduladores de la expresión de VEGFR (por ejemplo, modulador de expresión de VEGFR1 Sirna-027) o inhibidores de la señalización aguas abajo del receptor de VEGF. En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente antagonista de VEGF es bevacizumab, pegaptanib, ranibizumab, sorafenib, sunitinib, AE-941, VEGF Trap, pazopanib, vandetanib, vatalanib, cediranib, fenretinida, esqualamina, INGN-241, tetratiomolibdato oral, tetratiomolibdato, Panzem NCD, 2-metoxiestradiol, AEE-788, AG-013958, bevasiranib sódico, AMG-706, axitinib, BIBF-1120, CDP-791, CP-547632, PI-88, SU-14813, SU-6668, XL-647, XL-999, IMC-1121B, ABT-869, BAY-57-9352, BAY-73-4506, BMS-582664, CEP-7055, CHIR-265, CT-322, CX-3542, E-7080, ENMD-1198, OSI-930, PTC-299, Sirna-027, TKI-258, Veglin, XL-184 o ZK-304709.

Bevacizumab (AVASTATIN®) (rhuMAB-VEGF) (anticuerpo monoclonal anti-VEGF) es un anticuerpo monoclonal recombinante humano / murino quimérico dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se prepara mediante ingeniería de residuos de unión a VEGF de un anticuerpo monoclonal murino anti-VEGF en regiones estructurales de la inmunoglobulina-1 humana (IgG1) (Ficha técnica de Avastin, 2004). Solo el 7 % de la secuencia de aminoácidos deriva del anticuerpo murino y un 93 % de IgG1. Bevacizumab se une y neutraliza todas las formas de VEGF humanas mediante el reconocimiento de los sitios de unión para los dos tipos de receptores VEGF humanos (flt-1 y flk-1). En modelos animales, se ha demostrado que el anticuerpo estabiliza tumores establecidos o suprime el crecimiento tumoral inhibiendo la angiogénesis inducida por VEGF.

La farmacocinética del bevacizumab es lineal después de dosis de 0,3 mg / kg o mayores (Anon, 2002). Después de infusiones intravenosas de 90 minutos de 0,3, 1, 3 y 10 mg / kg en pacientes con cáncer avanzado (n = 25), las concentraciones séricas máximas de bevacizumab oscilaron entre 5 y 9 mcg / ml, 21 a 39 mcg / ml, de 52 a 92 mcg / ml, y de 186 a 294 mcg / ml, respectivamente; se observó ligera acumulación con dosis repetidas (semanalmente), pero esto no fue significativo y la farmacocinética se mantuvo lineal. Se obtuvieron niveles estacionarios de bevacizumab 100 días después de 1 a 20 mg / kg por semana, cada 2 semanas o cada 3 semanas.

La dosis recomendada de bevacizumab es de 5 miligramos / kilogramo infundidos por vía intravenosa durante 30 minutos cada 2 semanas hasta que la progresión de la enfermedad disminuye. Bevacizumab debe seguir a la quimioterapia. No se ha establecido la eficacia del bevacizumab en monoterapia. Bevacizumab (que puede

coadministrarse con gemcitabina y docetaxel, o dentro de una semana antes o después de la quimioterapia), se administra por vía intravenosa, a aproximadamente 1 mg / kg a aproximadamente 15 mg / kg, preferiblemente aproximadamente 5 mg / kg.

5 Los métodos y las composiciones de la divulgación son útiles en terapias de combinación, incluyendo terapias con bevacizumab. Como se divulga en el presente documento, un retrovirus competente para la replicación (RCR) de la divulgación que comprende un gen terapéutico (por ejemplo, un gen citotóxico) es útil en el tratamiento de trastornos proliferativos celulares. Una ventaja del RCR de la divulgación incluye su capacidad para infectar células en replicación cancerosas. Cuando el transgén del vector comprende un gen citotóxico (por ejemplo, un gen que  
10 codifica un polipéptido que convierte un agente no citotóxico en un agente citotóxico) proporciona la capacidad para destruir células cancerosas.

La divulgación proporciona métodos para tratar trastornos proliferativos celulares, tales como cáncer y neoplasias, que comprenden administrar un vector de RCR de la divulgación producido por las células HT1080 + T5.0002 o células derivadas de HT1080 similares que producen vectores que codifican otros genes heterólogos, seguido de  
15 tratamiento con un agente quimioterapéutico o un agente anticanceroso. En una realización, el vector de RCR se administra a un sujeto durante un período de tiempo previo a la administración del agente quimioterapéutico o anticanceroso que permite que el RCR infecte y se replique. El sujeto se trata después con un agente quimioterapéutico o un agente anticanceroso durante un periodo de tiempo y dosis para reducir la proliferación o  
20 matar las células cancerosas. En un aspecto, si el tratamiento con el agente quimioterapéutico o anticanceroso reduce, pero no mata el cáncer / tumor (por ejemplo, remisión parcial o remisión temporal), el sujeto puede tratarse después con un agente terapéutico no tóxico (por ejemplo, 5-FC) que se convierte en un agente terapéutico tóxico en la células que expresan un gen citotóxico (por ejemplo, citosina-desaminasa) del RCR. Usando dichos métodos, los vectores RCXR de la divulgación se propagan durante un proceso de replicación de las células tumorales, dichas  
25 células pueden después ser destruidas por el tratamiento con un agente anticanceroso o quimioterapéutico y puede matarlas adicionalmente utilizando el procedimiento de tratamiento con RCR descrito en el presente documento.

En aún otra realización de la divulgación, el gen heterólogo puede comprender una secuencia codificante para un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de cáncer). En esta realización, las células que comprenden un trastorno proliferativo celular se infectan con un RCR que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica el antígeno diana para proporcionar la expresión del antígeno diana (por ejemplo, la sobreexpresión de un antígeno de cáncer). A continuación, se administra al sujeto un agente anticanceroso que comprende un resto afín dirigido que interacciona específicamente con el antígeno diana. El resto afín dirigido puede estar unido operativamente a un  
30 agente citotóxico o puede ser por sí mismo un agente anticanceroso. Por lo tanto, una célula cancerosa infectada por el RCR que comprende las secuencias codificantes del antígeno diana, aumenta la expresión de la diana en la célula cancerosa, dando como resultado un aumento de la eficiencia/ eficacia del direccionamiento citotóxico.

Se ha demostrado que el bloqueo de las interacciones entre las células del sistema inmunológico tiene efectos inmunológicos significativos, ya sea de activación o de supresión (Waldmann Annu Rev Med. 57:65 2006). Por ejemplo, se ha demostrado que el bloqueo de la interacción de CTLA-4 (CD 152) y B7.1 (CD80) que modula la activación de células T causa estimulación inmunitaria, presumiblemente bloqueando esta interacción supresora (Peggs et al. Curr. Opin. Immunol. 18:206, 2006). Este bloqueo se puede lograr potencialmente mediante anticuerpos contra CTLA-4 o por B7.1 soluble. La administración sistémica de estos tipos de moléculas puede tener efectos globales indeseables que pueden conducir, como mínimo, a efectos secundarios perjudiciales, o incluso a la  
45 muerte, en el caso de un agonista de C28 (Suntharalingam et al. NEJM 355 1018 2006). Pfizer ha estado desarrollando uno de estos anticuerpos anti-bloqueo CTLA-4 (CP-675,206) como un reactivo contra el cáncer, pero recientemente ha dejado de desarrollarlo debido a los efectos secundarios significativos. La administración local de moléculas de bloqueo que se liberan en el medio ambiente local, del tumor después de la infección con un vector competente para la replicación que codifica dichas moléculas que se liberan en el espacio extracelular, proporciona la modulación inmunológica localmente y evita estos serios efectos secundarios. Las moléculas de bloqueo son anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, versiones solubles del ligando natural u otros péptidos que se unen a tales receptores.

Así, en otra realización más, un RCR de la divulgación puede comprender una secuencia codificante que comprende un dominio de unión (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, dominio de anticuerpo o ligando de receptor) que interacciona específicamente con un antígeno o ligando afín. El RCR que comprende la secuencia de codificación para el dominio de unión puede usarse después para infectar células en un sujeto que comprende un trastorno proliferativo celular, tal como una célula cancerosa o célula neoplásica. A continuación, la célula infectada expresará el dominio de unión o anticuerpo. Un antígeno o afín unido operativamente a un agente citotóxico o que es citotóxico en sí mismo puede administrarse a un sujeto. Por consiguiente, el afín citotóxico matará selectivamente las células infectadas que expresen el dominio de unión. Como alternativa, el propio dominio de unión puede ser un agente anticanceroso.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como

VH), y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). El término anticuerpo engloba fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, fragmento Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos.

Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas que se denominan regiones estructurales (FR). La extensión de la región estructural y las CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH N.º 91-3242 y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En el presente documento se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL está compuesta típicamente por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi, en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Un "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un dominio del dominio variable o constante de las moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina contienen típicamente dos láminas β formadas por aproximadamente siete hebras β y un enlace disulfuro conservado (véase, por ejemplo, A. F. Williams y A. N. Barclay 1988 *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405). Las estructuras canónicas de los bucles hipervariables de una variable de inmunoglobulina pueden deducirse a partir de su secuencia, como se divulga en Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:799-817; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Tomlinson et al. (1995) *EMBO J.* 14(18):4628-38.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "secuencia de dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir todo o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N o C-terminales, los aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o puede incluir otras alteraciones. En una realización, un polipéptido que incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión diana (o "sitio de unión a antígeno"), por ejemplo, una estructura que interacciona con Tie1, por ejemplo se une a o inhibe Tie1.

La cadena de VH o VL del anticuerpo puede incluir además toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de este modo una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina están interconectadas a través de, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de la cadena pesada incluye tres dominios CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente participan en la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunológico (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. El término "anticuerpo" incluye inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de los mismos). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos lambda o kappa. En una forma de realización, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad dependiente de anticuerpo y / o citotoxicidad mediada por complemento.

El término "anticuerpo mono-específico" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y afinidad para una diana particular, por ejemplo epítipo. Este término incluye un "anticuerpo monoclonal" que se refiere a un anticuerpo que se produce como una única especie molecular, por ejemplo, a partir de una población de células aisladas homogéneas. Una "composición de anticuerpo monoclonal" se refiere a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos en una composición que incluye una única especie molecular de anticuerpo. En una realización, un anticuerpo monoclonal es producido por una célula de mamífero. Una o más especies de anticuerpos monoclonales pueden combinarse.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR pueden ser humanas, por ejemplo, CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC. Cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. La CDR3 de la CH puede ser humana. Una o más de las regiones estructurales pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 de las CH o CL. En una realización, todas las regiones estructurales son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de líneas germinales, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o efectivamente humanas. En otra realización, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95 o 98 % de las regiones estructurales (por ejemplo FR1, FR2 y FR3, colectivamente, o FR1, FR2, FR3 y FR4, colectivamente) o el anticuerpo entero puede ser humano o efectivamente humano. Por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 pueden ser colectivamente, por lo menos, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 o 99



% idénticos a una secuencia humana codificada por un segmento V de la línea germinal humana de un locus que codifica una secuencia de la cadena ligera o pesada.

5 Todo o parte de un anticuerpo puede estar codificado por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Ejemplos de genes de inmunoglobulina humana incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 y IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 kDa o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH<sub>2</sub> (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de 10 inmunoglobulinas de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) están codificadas, de forma similar, por el gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionadas en lo que antecede, por ejemplo gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). Una cadena ligera se refiere a cualquier polipéptido que incluya un dominio variable de la cadena ligera. Una cadena pesada se refiere a cualquier polipéptido que incluya un dominio variable de la cadena pesada.

15 La divulgación proporciona un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular. El sujeto puede ser cualquier mamífero y, preferentemente, es un ser humano. El sujeto se pone en contacto con un vector retroviral competente para la replicación recombinante de la divulgación. El contacto puede ser *in vivo* o *ex vivo*. Los métodos de administración del vector retroviral de la divulgación son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, 20 administración sistémica, administración tópica, administración intraperitoneal, administración intramuscular, intracraneal, cerebroespinal, así como administración directamente en el sitio de un tumor o trastorno proliferativo celular. Otras vías de administración conocidas en la técnica.

25 Por lo tanto, la divulgación incluye diversas composiciones farmacéuticas útiles para tratar un trastorno proliferativo celular. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación se preparan llevando a un vector retroviral que contiene una secuencia polinucleotídica heteróloga útil en el tratamiento o modulación de un trastorno proliferativo celular de acuerdo con la divulgación a una forma adecuada para la administración a un sujeto usando vehículos, excipientes y aditivos o auxiliares. Los vehículos o auxiliares usados con frecuencia incluyen carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteína de leche, gelatina, almidón, vitaminas, 30 celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilenglicoles y disolventes, tales como agua estéril, alcoholes, glicerol y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes. Entre los conservantes se incluyen antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares, como se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>a</sup> ed. Easton: Mack Publishing Co., 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y el The National Formulary XIV, 14<sup>a</sup> ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975). El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con las habilidades de rutina en la técnica. Véase Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7<sup>a</sup> ed.)

40 Por ejemplo, y no a modo de limitación, un vector retroviral útil en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular incluirá una proteína ENV anfotrópica, proteínas GAG y POL, una secuencia del promotor en el genoma retroviral de la región U3, y toda la secuencia que actúa en cis necesaria para la replicación, empaquetamiento e integración del genoma retroviral en la célula diana.

45 Como se ha descrito anteriormente, la divulgación proporciona células huésped (por ejemplo, células 293 o células HT1080) que se transducen (transforman o transfectan) con un vector proporcionado en el presente documento. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido (por ejemplo, tal como se utiliza con células 293T), una partícula vírica (tal como se utiliza con células HT1080), un fago, etc. Las células huésped pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes, o amplificar un polinucleótido codificador. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las que se usaron previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para los expertos en la técnica y en las referencias citadas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Sambrook, Ausubel y Berger, así como, por ejemplo, Freshney (1994) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 3<sup>a</sup> ed. (Wiley-Liss, New York) las referencias citadas en el mismo.

55 En una realización de la divulgación, una célula productora produce vectores retrovirales competentes para la replicación que tienen una estabilidad incrementada con respecto a los vectores retrovirales producidos por técnicas convencionales de transfección transitoria. Dicha estabilidad incrementada durante la producción, la infección y la replicación es importante para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares. La combinación de eficiencia de la transducción, estabilidad de los transgenes y selectividad de la diana se proporciona por el retrovirus competente para la replicación. Las composiciones y métodos proporcionan estabilidad del inserto y mantienen la actividad de transcripción del transgén y la viabilidad de traducción del polipéptido codificado.

65 Los ejemplos siguientes tienen por objeto ilustrar la invención y no pretenden limitar la divulgación más amplia anterior.

## Ejemplos

Se produjo AC3-yCD2 (partícula vírica "V") a partir de una línea productora HT1080 + T5.0002 derivada de la línea celular de fibrosarcoma humano HT1080 (ATCC, n.º de catálogo CCL-121) obtenida directamente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (PO Box 1549, Manassas, VA).

La línea celular HT1080 + T5.0002 se expandió para crear un pre-banco y un posterior banco de células maestras (MCB). MCB se utilizó para producir lotes clínicos. El diagrama de flujo para generar el pre-banco y el banco de células maestras se muestra en la Figura 1.

El vector viral Toca511 está codificado por un plásmido (pAC3-yCD2; también conocido como T5.0002) que consiste en 11.893 pares de bases de nucleótidos. El diagrama 1 a continuación proporciona un mapa de enzimas de restricción de la construcción total del plásmido pAC3-yCD2 junto con la localización de la secuencia de ciertos elementos genéticos.

**Esquema general para preparar líneas celulares productoras de expresión estable que construyen el vector competente para la replicación AC3-yCD2 (V).** La línea de células productoras de vectores "HT1080 + T5.0002", se produjo mediante transducción de células HT1080 intactas con virus AC3-yCD2 producidos de forma transitoria en células 293T mediante transfección (véase la figura 1). La transfección transitoria utilizada para producir AC3-yCD2 (partículas víricas) se llevó a cabo usando la "reserva de plásmido cualificada" secuenciada con GLP. Más específicamente, el vector AC3-yCD2 producido de forma transitoria se recogió después de 48 horas después de la transfección y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm con 0,8 ml de sobrenadante filtrado usado para transducir un cultivo confluyente al 75 % de células HT1080 que contienen 15 ml de medio. Este volumen de infección se convirtió en una dosis de transducción aproximada de aproximadamente 0,1 unidades de transducción (UT) por célula. Se dejó que la transducción se extendiera por todo el cultivo durante 9 días con células realimentadas o pasadas cada 2-4 días antes de congelar la reserva de prebanco inicial que consistía en 12 viales, de modo que cada vial contenía aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por vial. Los medios de congelación incluían DMSO al 10 %, USP (Cryoserv, Bioniche Pharma USA, LLC, Lake Forest, IL) y suero bovino fetal al 90 % irradiado con rayos gamma (Hyclone laboratorios, Inc, Logan Utah). Las células se congelaron en un congelador a -80 °C y después se transfirieron a un congelador de nitrógeno líquido en condiciones de fase de vapor al día siguiente. El medio utilizado para el crecimiento de células HT1080 + T5.0002 para producir el vector comprende un medio DMEM definido, GlutaMax (sustituto de L-glutamina), aminoácidos no esenciales (NEAA) y suero bovino fetal (FBS) definido.

La línea celular 293T se desarrolló a partir de células 293 HEK (riñón embrionario humano) y se describió originalmente en 1987 (Dubridge 1987). La línea celular se desarrolló transfecando un mutante de antígeno-T de SV40 sensible a la temperatura, tsA1609 (Dubridge 1987), en células HEK 293 (Graham 1977). Las células 293T son más susceptibles a la transfección que la línea celular HEK 293 original. Debido a su mayor transfectabilidad, las células 293T se han usado habitualmente para producir vectores de título elevado mediante transfección transitoria (Yang et al., Hum. Gene Ther. 10: 123 - 132 1999).

**Ejemplo 2: Preparación del vector a partir de la línea productora de expresión estable HT1080 + T5.0002 como una línea adherente con suero bovino fetal.** Las células HT1080 + T5.0002 se cultivan en recipientes de cultivo de células multicapa desechables (Cell Stack, Corning). La producción del vector retroviral Toca 511 bruto se lleva a cabo recolectando el medio acondicionado de cultivos confluentes de células HT1080 + T5.0002 recolectadas cada 10-24 horas durante 2-4 ciclos de recolección usando un proceso discontinuo alimentado manualmente usando múltiples pilas de células que contienen aproximadamente 1,2 l de medios acondicionados cada uno. El vector retroviral TOCA 511 en bruto se recoge directamente en bolsas de proceso de 10 – 20 l y se almacena a 2-8 °C hasta que se recogen aproximadamente 40 l de material. La muestra de la cosecha bruta combinada utilizada para PTC micoplasma, pruebas víricas in vitro, carga biológica, titulación de PCR informativa y retenciones.

El material de vector en bruto se clarifica pasando a través de un cartucho de filtro de 0,45 micrómetros y se trata con Benzona para digerir el ADN genómico de la célula huésped. El vector TOCA 511 digerido con ADN y clarificado se captura a continuación y se concentra usando cromatografía de intercambio aniónico (AEX). El producto en bruto concentrado eluido se somete a continuación a una etapa de intercambio de tampón y purificación usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El tampón de formulación comprende tampón de formulación basado en Tris que contiene cloruro de sodio, sacarosa, manitol, ascorbato, ácido ascórbico y seroalbúmina humana. El volumen formulado se filtró a través de 0,2 µm para asegurar la esterilidad, se obtuvieron muestras para ensayo y después se repartió en múltiples recipientes como material a granel almacenado congelado por debajo de (<) -65 °C.

El vector producido a partir de células HT1080 + T5.0002 se analizó en células PC3 (adenocarcinoma de próstata humana) intactas o células U-87 (glioblastoma-astrocitoma humano), dependiendo de la prueba. Estas pruebas incluyeron; (1) transferencia de la expresión de la proteína CD (citosina desaminasa) mediante análisis Western, (2) actividad de CD funcional de la proteína CD para convertir 5-FC en 5-FU mediante análisis HPLC, así como (3) medición de la capacidad para que 5-FC mate células U-87 (ensayo MTS) transducidas con AC3-yCD2 (V).

**Ejemplo 3: Construcción de vectores que codifican citosina desaminasa, proteína fluorescente verde (GFP), interferón gamma (IFN) de ratón y otras proteínas o ácidos nucleicos.** Estos vectores retrovirales replicativos se construyeron como se ha descrito previamente en el documento WO 2010/036986. La Tabla 1 que describe la naturaleza de algunos de estos vectores se incluye a continuación.

5

Tabla 1: Construcciones de vectores y nombres

| Código de ref. | Nombre de referencia | Nombre original           | Prom. en 5'LTR | Envoltura     | Vector | IRES | Transgén               | 3'LTR  |
|----------------|----------------------|---------------------------|----------------|---------------|--------|------|------------------------|--------|
| T5.0000        | pACE-yCD             | pACE-CD (Tai et al. 2005) | CMV            | Anfo. (4070A) | pACE   | EMCV | CD de levadura salvaje | MLV U3 |
| T5.0001        | pAC3-yCD1            | CD secuencia opt.         | CMV            | Anfo. (4070A) | pAC3   | EMCV | CD modificada          | MLV U3 |
| T5.0002        | pAC3-yCD2            | CDopt+3pt                 | CMV            | Anfo. (4070A) | pAC3   | EMCV | CD modificada          | MLV U3 |
| T5.0006        | pAC3-eGFP            | pAC3-emd, pAC3GFP         | CMV            | Anfo. (4070A) | pAC3   | EMCV | GFP esmeralda          | MLV U3 |
| T5.0007        | pAC3-yCD             | pAC3-yCD                  | CMV            | Anfo. (4070A) | pAC3   | EMCV | CD de levadura salvaje | MLV U3 |
|                | pAC3-mIFNg           | pAC3-mIFNg                | CMV            | Anfo. (4070A) | pAC3   | EMCV | IFN gamma de ratón     | MLV U3 |
|                | pAC3-hIFNg           | pAC3-hIFNg                | CMV            | Anfo. (4070A) | pAC3   | EMCV | IFN gamma humano       | MLV U3 |

Otros vectores que se pueden producir usando las líneas celulares y los métodos descritos en la presente solicitud también se describen en el documento WO 2010/036986. Estos incluyen vectores que codifican anticuerpos de cadena sencilla, IL-2, ARNim y ARNic bajo el control de un promotor pol III y secuencias diana de ARNic.

10

**Ejemplo 4: Ensayo de titulación de PCR cuantitativa** La concentración del vector funcional, o título, se determina usando un método basado en PCR cuantitativa (PCRc). En este método, el vector se titula infectando una línea celular huésped transducible (por ejemplo, células de carcinoma prostático humano PC-3, ATCC n.º cat. CRL-1435) con un volumen estándar del vector y midiendo la cantidad resultante de provirus presente dentro de las células huésped después de la transducción. Las células y el vector se incuban en condiciones de cultivo estándar (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>) durante 24 horas para permitir una infección completa antes de la adición del AZT antirretroviral para detener la replicación del vector. A continuación, se recogen las células de la placa de cultivo y se purifica el ADN genómico (ADNg) usando un kit de purificación de ADNg de Invitrogen Purelink y se eluye de la columna de purificación con agua estéril libre de RNasa / DNasa. La relación de absorbancia A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> se mide en un espectrofotómetro para determinar la concentración y la pureza relativa de la muestra. Las concentraciones de ADNg se normalizan con agua adicional libre de RNasa / DNasa hasta la concentración más baja de cualquier conjunto dado de preparaciones de ADNg de tal manera que el ADN de entrada para la PCRc sea constante para todas las muestras analizadas. La pureza del ADN genómico se evalúa además mediante electroforesis de una alícuota de cada muestra en un gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio. Si la muestra pasa por un intervalo de absorbancia A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> de 1,8-2,0 y muestra una única banda de ADNg, la muestra está lista para el análisis PCRc del número de copias del provirus del vector. Utilizando cebadores que interrogan la región LTR del provirus (ADN del vector transcrito inversamente y ADN del vector que está integrado en el ADNg del huésped), la PCRc se realiza para estimar el número total de eventos de transducción que se produjeron cuando se usó el volumen conocido del vector para transducir el número de células conocido. El número de eventos de transducción mediante reacción se calcula a partir de una curva estándar que utiliza un plásmido portador de la diana de un número de copias conocido que se diluye en serie desde 10<sup>7</sup> a 10 copias y se mide en condiciones idénticas de PCRc como las muestras. Conociendo cuántos equivalentes genómicos se usaron para cada reacción de PCRc (a partir de la concentración previamente determinada) y cuántos acontecimientos de transducción que se produjeron por reacción, los inventores determinaron el número total de acontecimientos de transducción que se produjeron en base al número total de células que estaban presentes en el tiempo de transducción. Este valor es el título del vector después de la dilución en el medio que contiene las células durante la transducción inicial. Para calcular el valor de título corregido, la dilución se corrige multiplicando por el volumen de cultivo y el volumen del título dividido por el volumen de título. Estos experimentos se realizan en cultivos por duplicados y se analizan mediante PCRc usando mediciones por triplicado para cada condición para determinar un título promedio y con su desviación estándar y coeficiente de varianza asociados.

15

20

25

30

35

40

**Ejemplo 5: Ensayo de potencia para vectores que codifican citosina desaminasa.** Este ensayo evalúa muestras de células para determinar la actividad de citosina desaminasa 4 días después de la transducción y mide tanto la capacidad de replicación del vector como la correspondiente actividad de citosina desaminasa. Se cultivaron células U-87 en placas de 96 pocillos y se transdujeron con una serie de diluciones de virus (hasta 12 diluciones a intervalos

45

de semilog). Se añadió 5-fluorocitosina a las células durante una hora, se detuvo la reacción mediante la adición de ácido tricloroacético al 10 % y la mezcla filtrada resultante se analizó mediante HPLC para determinar la actividad de la citosina desaminasa midiendo el 5-fluorouracilo producido. El ensayo de HPLC se realizó en una unidad Shimadzu LC20AT conectada en serie con un detector de fotomatrix y un autoinyector. El método de HPLC utilizó una columna Hypersil BDS C18N de forma isocrática a 1 ml / min con 95 % de tampón A: fosfato de amonio 50 mM que contiene 0,1 % de perclorato de tetra-n-butilamonio con ajuste de pH del tampón a 2,1 con ácido fosfórico y 5 % de disolvente B: 100 % de metanol. El tiempo de carrera fue de 6 minutos. El conjunto de detectores de fotodiodos explora de 190 a 350 nm con cromatogramas seleccionados para mostrar absorbancia a 264 nm para 5-fluorouracilo. La función Buscador se utiliza para transferir datos en un informe masivo con el tiempo de retención de 5-fluorouracilo y el área a 264 nm y el tiempo de retención de 5-fluorocitosina y el área a 285 nm. El área del pico se representa después frente a la dilución introducida para generar un ajuste de curva de 4 parámetros y los valores de CE<sub>50</sub> de la muestra de ensayo se comparan con un vector de referencia interno (véanse las figuras 10 y 11 para ejemplos de estos gráficos).

**Ejemplo 6: Purificación y concentración del vector.** Los vectores de la divulgación se fabricaron mediante transfección transitoria sobre las células 293T o de un grupo de células productoras o de una línea celular productora clonada. El medio puede estar con suero o libre de suero y las células se pueden cultivar como células adherentes o en suspensión, normalmente en el modo de perfusión. El medio se recogió y cuando se hizo a partir de las líneas de células productoras estables, se almacenó durante hasta 2 semanas a 2-8 grados centígrados. El vector de las líneas celulares estables tuvo una semivida a 2-8 grados C que es mayor de 7 días, mientras que esto no es cierto para el material producido mediante transfección transitoria. Esta cosecha a granel se filtró después a través de un cartucho de filtro de 0,45 micrómetros, se trató con benzonasa (L. Shastri et al Hum Gene Ther 15:221 2004) y otras etapas de cromatografía en columna. (véase, por ejemplo, US5792643; T. Rodriguez et al. J Gene Med 9:233 2007; P.Sheridan et al Mol.Ther. 2:262-275 2000). Las preparaciones de vectores se cargaron en una columna de intercambio aniónico y el vector se eluyó en un gradiente de NaCl. La fracción que contiene el vector se identificó inicialmente utilizando el ensayo de PCR (ejemplo 4), y posteriormente mediante la A260, y las fracciones positivas se recogieron y agruparon. A continuación, la preparación se cargó en una columna de exclusión por tamaño (SEC) para eliminar la sal y otros contaminantes restantes. La SEC se eluye con tampón de formulación y la fracción de vector en la columna SEC se recogió a partir del volumen de huecos y se ensayó como material a granel para el título. A continuación, se filtró a través de filtros de 0,2 micrómetros y 0,8 a 3 ml se alicuotaron en viales. El material clínico se libera en base a pruebas estándar, tales como esterilidad, micoplasma y endotoxinas, además de la potencia específica del producto (ejemplo 5, Figuras. 10 y 11), resistencia (ejemplo 4) y ensayo de identidad. El título se determina como unidades de transducción (UT) mediante cuantificación por PCR del ADN del vector vírico integrado en las células diana (Ejemplo 4). El producto final tiene como objetivo tener un título de hasta 10<sup>9</sup> TU / ml formulado en solución de sacarosa isotónica tamponada con Tris, como un inyectable estéril.

En general, para determinar con exactitud y precisión la resistencia de los lotes de vectores, se ha desarrollado un ensayo del título basado en PCR cuantitativa (descrito en términos generales en el ejemplo 4). Los detalles del procedimiento de ensayo consisten en las siguientes etapas:

**Transducción.** Las transducciones se realizan en un formato de placa de 12 pocillos usando la línea celular PC-3 derivada del adenocarcinoma prostático humano estable. Para cada muestra de ensayo, se usan tres diluciones de la preparación del vector no titulada para transducir las células PC-3 en pocillos por triplicado. La replicación del virus se detiene 24 horas después de la transducción con azidotimidina (AZT). Las células se mantienen durante 24 - 64 horas adicionales antes de la recolección y purificación del ADN genómico.

**Ejemplo 8: Clonación de un grupo no clonal de células HT1080 infectadas.** *Siembra de la dilución.* Los medios precalentados y múltiples placas de cultivo celular de 96 pocillos se marcaron con el fin de identificar el clon basado en la placa y la posición del pocillo y los pocillos se llenaron con medios precalentados que contenían una suspensión de células individuales del HT1080. Un pase temprano de células HT1080 infectadas al 100 % se recogió mediante tripsinización y creación de una suspensión de células que consistía en 1 célula por 600 microlitros. Se suministraron 200 microlitros en cada pocillo de una placa de 96 pocillos con el fin de sembrar aproximadamente 0,3 células por pocillo. Al realizar este procedimiento, una mayoría de los pocillos recibieron 0, 1 o 2 células por pocillo. Las células se dejaron unir durante aproximadamente 4 horas y cada pocillo se examinó para eliminar los pocillos que habían recibido más de 1 célula por pocillo o que estaban vacíos.

*Propagación del clon.* Los pocillos que contenían inicialmente 1 célula por pocillo se cultivaron reemplazando ½ del medio (aproximadamente 100 µl) con 100 µl fresco cada 3-4 días por cada pocillo. Se evitó la transferencia accidental de células de un pocillo a otro sustituyendo la punta utilizada para alimentar cada pocillo durante el reemplazo del medio. Se requirió un reemplazo de medio completo cuando las células comenzaron a aproximarse a la confluencia en el pocillo. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, cada candidato clonal se pasó a un pocillo de una placa de 48 pocillos para continuar la expansión. Cada clon se propagó y se pasó a un pocillo de una placa de 6 pocillos, seguido de un matraz T-25, seguido de un matraz T-75 cada vez que las células alcanzaron la confluencia. Una vez que las células clonales alcanzaron la confluencia en un matraz T-75, se prepararon al menos 2-3 viales de células crioconservadas que contenían 1-2x10<sup>6</sup> células por vial.

*Selección de clones basada en el rendimiento.* Una vez que los candidatos a clon se congelaron, se llevaron a cabo experimentos de cultivo celular para identificar el clon de mejor rendimiento y los clones de repuesto basados en el rendimiento de la producción del título y en las características ideales del cultivo celular. El mejor clon se eligió basándose en (1) la capacidad del clon para proporcionar los títulos sostenidos más altos durante 2-4 días posteriores con sustitución diaria de medio [véase la Figura 12 y la Tabla 2, a continuación]; (2) la capacidad del virus producido para transferir la expresión del gen deseado de interés a una célula intacta (véanse las Figuras 10 y 11); (3) la capacidad del clon para dividirse razonablemente con un tiempo de duplicación entre 18 - 30 horas y la capacidad para alcanzar la confluencia al 100 % como un césped uniforme de células con un desprendimiento celular mínimo al llegar a la confluencia.

**Ejemplo 1.101: Infección de líneas celulares -17 y Cf2-Th para producir un conjunto no clonal y posteriores candidatos a la línea celular productora del vector clonal.** Para producir grupos de productores de vectores de las líneas celulares D-17 (osteosarcoma canino ATCC # CCL-183) y Cf2-Th (de timo canino ATCC n.º CRL-1430) que expresan el vector retroviral competente para la replicación de MLV, se usaron los exactos mismos métodos descritos anteriormente para las células HT-1080 para crear las líneas celulares D-17 y Cf2-Th. Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación.

**Tabla 2: Datos que apoyan la creación de grupos de productores y los posteriores clones de dilución de vectores retrovirales competentes para la replicación de HT-1080, D-17 y Cf2-Th**

| Línea celular productora del vector de la línea celular | Vector competente para la replicación de MLV expresado | Línea celular parental | Muestra de titulación  | Títulos observados (UT/ml)*                  |
|---|--|------------------------|--|--|
| HT1080+T5.0002 (grupo no clonal)                        | AC3-yCD2   | HT-1080                | HT+T5.0002, Día 2<br>HT+T5.0002, Día 3<br>HT+T5.0002, Día 4<br>HT+T5.0002, Día 5.5     | 1,56E+06<br>2,23E+06<br>1,90E+07<br>2,57E+07 |
| HT5.yCD2.128A (clon de dilución)                        | AC3-yCD2   | HT-1080                | Clon 12-8, Día 0<br>Clon 12-8, Día 1<br>Clon 12-8, Día 2<br>Clon 12-8, Día 3           | 5,26E+06<br>7,94E+06<br>1,00E+07<br>1,02E+07 |
| D17+T5.0002 (grupo no clonal)                           | AC3-yCD2   | D-17                   | D17+T5.0002, Día 2<br>D17+T5.0002, Día 3<br>D17+T5.0002, Día 4<br>D17+T5.0002, Día 5.5 | 4,20E+06<br>3,83E+06<br>4,87E+06<br>1,39E+06 |
| D5.yCD2.1G7A (clon de dilución)                         | AC3-yCD2   | D-17                   | D5.yCD2.1G7A, Día 1<br>D5.yCD2.1G7A, Día 2   | 1,78E+06<br>2,54E+06                         |
|   |  |                        | D5.yCD2.1G7A, Día 3  | 4,24E+06                                     |
| CF2+T5.0002 (grupo no clonal)                           | AC3-yCD2   | Cf2-Th                 | CF2+T5.0002, Día 2<br>CF2+T5.0002, Día 3<br>CF2+T5.0002, Día 4<br>CF2+T5.0002, Día 5.5 | 4,17E+04<br>6,97E+03<br>4,97E+06<br>3,14E+06 |
| CF5.yCD2.3A12A (clon de dilución)                       | AC3-yCD2   | Cf2-Th                 | CF5.yCD2.3A12A, Día 1<br>CF5.yCD2.3A12A, Día 2<br>CF5.yCD2.3A12A, Día 3                | 1,81E+07<br>2,68E+07<br>3,78E+06             |

\*UT/ml indica unidades de transducción por ml, según se determina mediante métodos de PCRc cuantitativa para determinar el número de copias de los genomas de MLV províricos integrados después de la transducción en una línea celular U-87 intacta de titulación.

**Ejemplo 10: Ensayo de infectividad y transferencia de expresión de vectores retrovirales competentes para la replicación producidos a partir de células Cf2-Th infectadas con T5.0006 (vector competente para la replicación de expresión de GFP).** Se realizó una evaluación con el vector retroviral competente para la replicación, T5.0006 (V), que codifica el gen DE la proteína fluorescente verde (GFP) para evaluar la capacidad del vector para infectar y propagarse en líneas celulares tumorales derivadas de caninos. Para este estudio, se recibieron tres líneas celulares de glioblastoma canino, J3T-bg, SDT-3G y G06-A del laboratorio del Dr. Peter Dickinson (University of California, Davis; Vet Med Surgery and Radiological Sciences). Las tres de estas líneas celulares derivaron originalmente de explantes espontáneos de glioma y estaban dentro de 8-14 pases de los

aislados originales. Para probar la infectividad viral, se introdujeron 0,1 ml de sobrenadantes del virus T5.0006 (V) filtrados con 0,45 micrómetros en cultivos por triplicado de 2 ml que contenían  $4,4 \times 10^5$  células de cada tipo de tumor en placas de cultivo de 6 pocillos con la excepción de SDT-3G, que estaba a  $1,9 \times 10^4$  células. Se prepararon placas por triplicado, una placa para cada punto de tiempo. Para rastrear la infectividad, se recolectó una placa con infecciones por triplicado y pocillos de control no infectados los días 1, 3 y 6 para realizar el análisis FACS de determinar la presencia de fluorescencia de GFP para determinar el porcentaje de células infectadas cada día después de la infección. El sobrenadante de virus T5.0006 de inoculación derivó de cultivos infectados internos de células productoras estables Cf2-Th hechas como se ha descrito anteriormente y caracterizadas por el título del virus producido.

*Línea productora Cf2-Th+T5.0006 y virus T5.0006(V):* Un cultivo de células Cf2-Th, se infectó previamente con el virus T5.0006 (V) producido transitoriamente generado transfecando el plásmido pAC3-emd (también conocido como pT5.0006) en células 293T usando procedimientos estándar de transfección con fosfato cálcico. Después de varios pases y el día de la infección de las tres líneas de células tumorales de glioma canino, se recogieron los sobrenadantes víricos frescos de un cultivo Cf2-Th infectado confluyente y se pasaron a través de un filtro de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar cualquier célula Cf2-Th infectada viable.

*Infección de las tres líneas celulares de glioblastoma canino y la línea celular HT-1080 de control positivo:* Las tres líneas celulares de glioblastoma canino: J3Tbg, SDT-3G y G06-A, se recibieron como células criopreservadas el 20 de noviembre de 2008 del laboratorio de Dr. Peter Dickinson, University of California, Davis; Vet Med Surgery and Radiological Sciences. Las tres de estas líneas celulares derivaron originalmente de gliomas espontáneos y estaban dentro de 8-14 pases de los aislados originales como se indica en la documentación adjunta con la recepción de los viales congelados. La línea celular de control positivo HT1080 se obtuvo a partir de existencias congeladas internas originarias de la ATCC (CCL-121, Lote 6805248).

Se descongeló un vial de cada línea celular y se cultivó para varios pases en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y Glutamax 200 mM y se incubó a 37 °C en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 %. Un día antes de infectar las células, se sembró una placa de 6 pocillos con células  $5 \times 10^4$  / cm<sup>2</sup> ( $4,4 \times 10^5$  células / pocillo) para cada línea celular tumoral en 2 ml de medio DMEM completo recién preparado con la excepción de las placas SDT-3G que se prepararon a  $1,9 \times 10^4$  células / pocillo. Los cultivos HT1080 de control positivo se sembraron 3,5 horas antes de la adición del virus el mismo día de las infecciones víricas de la línea celular tumoral. Las infecciones víricas se realizaron mediante la adición de 0,1 ml de T5.0006 (V) filtrado a tres pocillos de cada placa de 6 pocillos dejando tres pocillos no infectados para servir como controles negativos para el análisis FACS. Después de la infección, las placas se devolvieron a la incubadora a 37 °C. Después de la infección, las placas se devolvieron a la incubadora a 37 °C. Se prepararon placas por triplicado para cada línea celular.

A los 1, 3 y 6 días después de la infección, se recogieron pocillos por triplicado de cada línea celular infectada y no infectada usando reactivo de triceano (Sigma-Aldrich), se lavaron en medio completo y después se fijaron con 1 % de paraformaldehído en PBS con 2 % de FBS y 0,09 % de azida sódica y se almacenaron refrigerados en la oscuridad o sobre hielo hasta que se sometieron a análisis FACS. Obsérvese que los cultivos restantes tras el punto de recolección del día 3 se pasaron el día 3.

*Análisis FACS:* Todas las células fijadas con paraformaldehído se analizaron en una máquina BD LSRII FACS localizada en Sidney Kimmel Cancer Center (SN H47200068) con análisis usando BD FACS Diva Software Versión 5.0.1. HT1080 y HT1080 y 100 % de células infectadas con GFP de una infección previa se utilizaron para establecer el acotamiento. Cada muestra se leyó una vez.

La Tabla 3 muestra los resultados promedio de las lecturas por triplicado del porcentaje de células infectadas después de 1, 3 y 6 días desde la infección. La figura 13 muestra la representación gráfica de los datos. Los datos sugieren que cada línea tumoral canina infectada con T5.0006 (V) demostró algún nivel de expresión de GFP por encima de los controles negativos de fondo, pero se observaron diferencias en la cinética de propagación del virus entre las diferentes líneas celulares tumorales. La línea tumoral G06-A demostró 94,5 % de positividad de GFP 6 días después de la infección, seguida de J3T-bg y SDT-3G, lo que demuestra un 81,2 % y 30,9 % de positividad para GFP en el mismo punto de recolección, respectivamente. Todos los controles fueron válidos con los controles no infectados y mostraron niveles insignificantes de fondo de expresión de GFP y la línea celular de control positivo permisivo de HT1080 que demuestra un 73,6 % de positividad de GFP al día 3 desde la infección (las muestras del día 6 se perdieron). En experimentos anteriores similares, usando las mismas condiciones, la línea de glioma U87 humana se convierte en un 80-90 % positiva para GFP.

Tabla 3. Resumen del porcentaje de células positivas para la expresión de GFP en tres líneas celulares de glioma canino después de la infección con el vector T5.0006 (GFP).

| Días después de la infección | J3T-bg no infectada (% positivos para GFP) | J3T-bg +T5.0006 (% positivos para GFP) | G06-A no infectada (% positivos para GFP) | G06-A +T5.0006 (% positivos para GFP) | SDT-3G no infectada (% positivos para GFP) | SDT-3G +T5.0006 (% positivos para GFP) | HT1080 no infectada (% positivos para GFP) | HT1080 +T5.0006 (% positivos para GFP) |
|------------------------------|--|--|---|---------------------------------------|--|--|--|--|
| <u>1 Día</u>                 | 0,8  | 0,7                                    | 0,0                                       | 13,8                                  | 0,3  | 1,6                                    | 0,3  | 2,5                                    |
| <u>3 Días</u>                | 0,5  | 13,4                                   | 0,1                                       | 61,8                                  | 0,3  | 8,1                                    | 0,0  | 73,4                                   |
| <u>6 Días</u>                | 0,3  | 81,2                                   | 6,2                                       | 94,5                                  | 2,2  | 30,9                                   | perdida                                    | perdida                                |

perdida= muestra de ensayo perdida

**Ejemplo 11: Adaptación de la línea celular productora de vectores del virus de MLV competentes para la replicación a partir de suero y dependencia de la adherencia de un cultivo en suspensión sin suero.** El proceso de adaptación libre de suero se realizó después del cribado e identificación de un clon de dilución adecuado de la línea celular productora de vectores competentes para la replicación de HT-1080. El proceso de adaptación libre de suero también se puede realizar con una línea celular HT1080 productora del vector no clonal. El proceso de adaptación se inició sembrando aproximadamente  $2 \times 10^7$  células en un matraz agitador de 125 ml que contenía 10 ml de medio acondicionado que contiene 5 % de suero y 10 ml de un medio libre de suero seleccionado de elección, que dio como resultando una concentración sérica reducida del 2,5 %. En este caso, el medio sin suero fue medio de expresión FreeStyle 293 distribuido a través de Invitrogen Corp, Carlsbad, CA. El cultivo se introdujo en una plataforma de agitación situada en una incubadora de cultivo de tejidos con control tanto de la temperatura como del gas de CO<sub>2</sub>. La plataforma de agitación se fijó a una velocidad preferida de 80 RPM y la incubadora se fijó a unas condiciones preferidas de 37 °C y unas condiciones preferidas de CO<sub>2</sub> al 5 %. Cada 3-7 días, el cultivo se realimentó recogiendo células que estaban en suspensión y se sembraron nuevamente en un nuevo matraz agitador que contenía 10 ml del mismo medio acondicionado inicial y 10 ml de medio fresco sin suero manteniendo un nivel de suero de aproximadamente 2,5 %. El cultivo se examinó en cada acontecimiento de realimentación con recuentos de células viables realizados según lo necesario para comprobar la propagación de células. Cuando las células mostraron evidencia de crecimiento basado en la duplicación de las células o el consumo de glucosa, una concentración de suero de 1,67 % se dirigió después ajustando la cantidad de volumen del medio acondicionado y medio libre de suero fresco. El cultivo se examinó nuevamente y se realimentó cada 3 - 7 días. Cuando las células muestran evidencia de crecimiento, se dirigió una concentración sérica de 1,25 % ajustando nuevamente el volumen de medio acondicionado y medio libre de suero fresco. Este proceso se continuó apuntando condiciones suero posteriores de 1,0 %, 0,9 %, 0,83 % hasta que las células estaban en condiciones libres de suero al 100 %. Durante este proceso de adaptación, el cultivo celular se expandió hasta aproximadamente 200 ml de volumen en un matraz de agitación de 1.000 ml dirigido a un cultivo viable mínimo de aproximadamente  $0,5$  a  $1,0 \times 10^6$  células / ml. Una vez que las células alcanzaron condiciones libres de suero al 100 %, las células se pasaron continuamente en condiciones libres de suero aislando células suspendidas individuales permitiendo que las células aglutinantes más pesadas se asentaran durante cortos períodos de tiempo sin agitación. Una vez que el cultivo consiste en aproximadamente el 95 % de la población de la suspensión de células individuales de forma consistente, el cultivo podría congelarse en medio de crioconservación consistente en DMSO al 10 % y 90 % de medio libre de suero usando condiciones estándar de congelación de células de mamífero.

**Ejemplo 12: El vector hecho a partir de las líneas celulares productoras estables es más estable que el vector hecho mediante transfección transitoria en almacenamiento a largo plazo.** *Producción del vector mediante transfección transitoria.* El sobrenadante bruto que contenía el virus MLV competente para la replicación que codifica el gen para la citosina desaminasa o el gen para la proteína fluorescente verde se produjeron mediante dos métodos de transfección transitoria. El primer método usó el procedimiento estándar de transfección con fosfato cálcico divulgado por Graham y van der Eb usando células 293T que se han usado habitualmente para producir vectores de título alto, tal como describieron originalmente Yang 1999. El segundo método de transfección utilizó el reactivo transfectante patentado disponible comercialmente (Fugene) distribuido por Promega (Madison, WI) Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los sobrenadantes del virus se filtraron usando un filtro de 0,2 µm o 0,45 µm, con partes alícuotas congeladas y almacenadas a temperaturas ≤ -65 °C. Los sobrenadantes clarificados congelados se titularon mediante el método de PCRc cuantitativa para establecer una concentración inicial de título infeccioso. Las pruebas posteriores del título en varias fechas revelaron que las preparaciones de virus no eran estables y perdían al menos un logaritmo del título tan rápidamente como 14 días como se analizó mediante el mismo método de PCRc cuantitativa (véase la Tabla 4).

*Producción de vectores a partir de líneas estables.* Para comparar este perfil de estabilidad con respecto al virus MLV competente para la replicación producido a partir de células HT-1080 infectadas de forma estable, se produjeron preparaciones del virus T5.0002 como se describe en el ejemplo anterior y posteriormente se purificaron y formularon en un tampón isotónico de cloruro de sodio Tris que contenía 10 mg /ml de sacarosa y 1 mg / ml de seroalbúmina humana. Los lotes de T5.0002 específicos utilizados en este estudio de estabilidad son los lotes T003-002-40L, M100-09, M101-09 y M102-09, con los últimos tres lotes producidos conforme a las buenas prácticas de fabricación (GMP). Para evaluar la estabilidad del virus, se usaron procedimientos para abordar (1) el título infeccioso; y (2) la transferencia de la expresión en células intactas.

*Almacenamiento.* Se retiraron dosis no diluidas y diluidas al 1/100 de T5.0002 del lote T003-002-40L de las condiciones de almacenamiento a largo plazo ≤-65 °C con viales descongelados posteriormente a los 3, 6 y 12 meses después del vial y probados dentro de los siguientes ensayos: Resistencia, potencia y DICT<sub>50</sub>.

60



**Tabla 4. Varios virus MLV competente para la replicación producidos mediante transfección transitoria**

| Descripción del virus ML de replicación | Línea celular parental (método de transfección) | ID de la muestra          | Título de PCRc (UT/ml) |
|---|---|---------------------------|------------------------|
| T5.0002                                 | 293T (Fosfato de calcio)                        | 051508-RCR-2              | 3,2x10 <sup>7</sup>    |
| T5.0002                                 | 293T (Fosfato de calcio)                        | 051508-RCR-2              | 1,4x10 <sup>6</sup>    |
| T5.0002                                 | 293T (Fosfato de calcio)                        | CS003 (2-D3-IN-080108-CS) | 1,3x10 <sup>6</sup>    |
| T5.0002                                 | 293T (Fosfato de calcio)                        | CS003 (2-D3-IN-080108-CS) | 2,4x10 <sup>4</sup>    |
| T5.0006 <sup>(2)</sup>                  | IIT-1080 (Fugene)                               | HT1080-D4-102508          | 2,3x10 <sup>6</sup>    |
| T5.0006                                 | HT-1080 (Fugene)                                | HT1080-D4-102508          | 2,8x10 <sup>5</sup>    |
| T5.0006                                 | 293T (Fugene)                                   | 293T-D2-102308            | 2,6x10 <sup>6</sup>    |
| T5.0006                                 | 293T (Fugene)                                   | 293T-D2-102308            | 2,3x10 <sup>5</sup>    |

Se prepararon lotes producidos conforme a las GMP, M100-09, M101-09 y M102-09 a partir de la línea celular productora estable HT1080 + T5.0002 purificada y almacenada a ≤ -65 ° C desde su preparación. Se extrajeron y descongelaron los viales a los 3 y 6 meses después del vial y se analizaron los siguientes ensayos: Resistencia, potencia, DICT50, pH, osmolalidad y aspecto.

*Título infeccioso mediante PCRc cuantitativa.* No se observa ninguna disminución del título para el vector viral purificado producido a partir de la línea celular HT-1080 infectada de forma estable cuando se almacena a ≤ -65 ° C durante un máximo de 12 meses para todos los lotes analizados. Las Tablas 5 y 6 muestran los títulos medidos para los lotes T003-002-40L (Tabla 5) y GMP (Tabla 6). La Figura 14 muestra la tendencia del título generado durante 12 meses para todos los lotes analizados.

**Tabla 5. Títulos medidos de los lotes de desarrollo T003-002-40L (sin diluir y a 1/100) a la liberación y 3,6 y 12 meses almacenados a ≤-65°C.**

| T003-002-40L | Liberación | 3M        | 6M       | 12M      |
|--------------|------------|-----------|----------|----------|
|              | UT/ml      |           |          |          |
| Sin diluir   | 1,14E+08   | 1,73 E+08 | 1,09E+08 | 2,71E+08 |
| 1/100        | 1,08E+06   | 2,79E+06  | 1,66E+06 | 3,82E+06 |

**Tabla 6. Títulos medidos de los lotes M100-09 (dosis alta), M101-09 (dosis media) y M102-09 (dosis baja) en la liberación y a los 3 y 6 meses de almacenamiento a ≤-65 °C.**

|         | Liberación | 3M       | 6M       | 1X F/T*  |
|---------|------------|----------|----------|----------|
|         | UT/ml      |          |          |          |
| M100-09 | 1,90E+08   | 1,00E+08 | 2,49E+08 | 2,38E+08 |
| M101-09 | 2,00E+07   | 1,08E+07 | 3,52E+07 | 3,56E+07 |
| M102-09 | 2,70E+06   | 1,22E+06 | 4,15E+06 | 4,01E+06 |

\*Se descongelaron los viales en el punto de tiempo 3M, se volvieron a congelar a ≤-65 °C y se analizaron con las muestras de 6 M.

Ensayo de transferencia de expresión biológica usando cultivo celular y análisis HPLC para evaluar la estabilidad del vector viral almacenado a ≤-65 °C. La estabilidad del vector se evaluó midiendo la capacidad del vector para infectar un tipo de célula intacta con varias diluciones y analizar la capacidad para convertir 5-fluorocitosina (5-FC) en 5-fluorouracilo (5-FU) a partir de la transferencia del gen de la citosina desaminasa del vector viral a la célula intacta infectada. La conversión de 5-FC en 5-FU se cuantifica mediante HPLC con los datos brutos procesados utilizando un método de regresión no lineal de los valores de dilución transformados. Ambas dosis (sin diluir y muestras diluidas a 1/100) del lote T003-002-40L no muestran disminución en la transferencia de la capacidad de expresión cuando se almacenan a ≤ -65 ° C durante hasta 12 meses. Tanto T003-002-40L (sin diluir) como M100-09 generaron una curva de dosis comparable a la del vector de referencia actual. M101-09 generó la curva esperada a 1/10 del vector no diluido (M100-09). T003-002-40L (1/100) y M102-09 generaron la curva esperada a 1/100 de su vector no diluido, respectivamente. Las Figuras 10 y 11 muestran la respuesta de la dosis de conversión de 5-FC para los lotes T003-002-40L (Figura 10) y GMP (Figura 11) en el último punto de tiempo analizado.

*Ensayo de DICT<sub>50</sub> sobre los lotes del vector.* La estabilidad del vector se evaluó midiendo la capacidad del vector para infectar un tipo de célula intacta calculando la dosis infecciosa a la que el 50 % de las células se infectarían en

condiciones de cultivo de tejidos (DICT50). El método utilizado para determinar si una célula estaba infectada se determinó mediante detección por PCR. En esta evaluación, no se observó disminución en la infectividad en base a la DICT50 cuando se almacenó a  $\leq -65$  °C durante un máximo de 12 meses para todos los lotes analizados dentro de la variabilidad actual del ensayo (% de CV del vector de referencia en 8 ensayos fue del 45 %). Las Tablas 13 y 14 muestran el valor de DICT50/ml medido para el lote T003-002-40L (Tabla 7) y GMP (Tabla 8).

**Tabla 7. DICT<sub>50</sub> del lote T003-002-40L (sin diluir y a 1/100) en la liberación y a los 3 y 12 meses a  $\leq -65$  °C**

| T003-002-40L | Liberación             | 3M      | 12M      |
|--------------|------------------------|---------|----------|
|              | DICT <sub>50</sub> /ml |         |          |
| Sin diluir   | 2,0E+08                | 9,0E+07 | 2,00E+08 |
| 1/100        | 1,3E+06                | 6,5E+05 | 7,95E+05 |

**Tabla 8. DICT<sub>50</sub> de los lotes de GMP M100-09 (dosis alta), M101-09 (dosis media) y M102-09 (dosis baja) en la liberación y a los 3 y 6 meses de almacenamiento a  $\leq -65$  °C.**

|         | Liberación             | 3M      | 6M      | 1X F/T*  |
|---------|------------------------|---------|---------|----------|
|         | DICT <sub>50</sub> /ml |         |         |          |
| M100-09 | 5,0E+07                | 5,0E+07 | 7,9E+07 | 5,01E+07 |
| M101-09 | 7,9E+06                | 1,3E+06 | 1,3E+07 | 1,26E+07 |
| M102-09 | 5,0E+05                | 5,0E+05 | 7,9E+05 | 5,01E+05 |

\*Se descongelaron los viales en el punto de tiempo 3M, se volvieron a congelar a  $\leq -65$  °C y se analizaron con las muestras de 6 M.

Basándose en los datos de estabilidad anteriores, el vector viral de MLV competente para la replicación purificado producido a partir de células HT - 1080 infectadas de forma estable es más estable que el vector idéntico producido por transfección transitoria cuando se almacena a temperaturas de  $\leq 65$  °C.

**Ejemplo 13: El vector T5.0002 hecho a partir de un clon de HT1080 y producido a partir de cultivos libres de suero en suspensión es tan potente como el vector fabricado a partir de la línea HT1080 + T5.0002 adherente en medio con suero bovino fetal, en un modelo de tumor de ratón.** El vector se preparó a partir de uno de los clones de suspensión libre de suero y de la línea celular HT1080 + T5.0002, y se purificó y procesó como se describe en el ejemplo 6.

En experimentos separados, estas preparaciones de vectores se usaron para tratar un modelo de tumor de glioma de ratón - Tu2449 en ratones B6C3F1 (H M. Smilowitz J Neurosurg 106: 652 - 659, 2007), en ratones se implantó intracranalmente el tumor y cuatro días más tarde se administraron dosis ascendentes del vector ( $10^4$ ,  $10^5$  UT/g de cerebro) a cohortes de 10 animales para ambas preparaciones de vectores. Al día 13, la dosificación de 5-FC se llevó a cabo dos veces al día mediante inyecciones i.p. (500 mg / kg dos veces al día) durante cuatro días y el tratamiento con 5-FC se llevó a cabo con un programa de 10 días sin tratamiento 4 días con tratamiento. Los gráficos de Kaplan-Meier mostraron que la supervivencia con el material de la línea clonada era al menos tan buena como la de la línea HT1080 + T5.0002. Ambos mostraron una supervivencia de 80-90 en los grupos de  $10^{5UT}$  después del día 100, mientras que los controles tuvieron una supervivencia mediana de aproximadamente 30 días.

**Ejemplo 14: Uso de vector purificado que codifica interferón gamma de ratón como terapia en un modelo de cáncer de ratón singénico.** El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de Toca 511 (que codifica  $\gamma CD2$ ) y Toca 621 (que codifica interferón gamma de ratón) en el modelo S91 / BALB/c mediante la evaluación de la propagación de nuevos vectores retrovirales basados en MLV en tumores S91 subcutáneos S91 de ratón (subQ) en ratones BALB / c inmunocompetentes. El vector se preparó a partir de: 1) HT108+T5.0002 (Toca 511) y es una preparación de un vector retroviral competente para la replicación portador del gen optimizado de la citosina desaminasa; 2) HT1080 + mIFN una línea de productores estable de Toca 621, un vector retroviral competente para la replicación portador del gen de interferón gamma; y 3) HT1080 + T5.0006 (GFP Vector) m, se administraron cada uno mediante inyección intratumoral (i.t.).

**Ratones.** Los ratones BALB / c hembra (edad ~ 8 semanas) se adquirieron en los Jackson Laboratories. Los ratones se aclimataron durante 7 días después de su llegada.

**Células tumorales.** Las células S91 Cloudman (ATCC, Manassas VA) derivadas del clon M-3, una línea celular productora de melanina se adaptaron al cultivo celular por Y. Yasumura, AH Tashjian y G. Sato de un melanoma Cloudman S91 en una F1 de ratón mecho (CX DBA). Las células se cultivaron en medio Eagles modificado de Dulbecco con suero bovino fetal al 10 %, piruvato sódico y Glutamax (Hyclone, Logan UT e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para su implantación. Las S91 se inyectaron  $1E5$  en 200  $\mu$ l i.v. y  $1E5$  en 100  $\mu$ l s.c.

Se implantaron s.c. en cuatro grupos de ratones BALB / c hembra (65 ratones, ~ 8 semanas de edad) en el flanco derecho células tumorales S91. Después de dejar que los tumores crecieran hasta alcanzar aproximadamente 50-125mm<sup>3</sup>, se administró a 3 ratones i.t. PBS (Grupo 1), a 10 ratones se inyectó i.t. Toca 511 4,7E8 / ml (Grupo 2), a 5 ratones se inyectó i.t. Toca 621 2,8E8 / ml (Grupo 3) y a 6 ratones se inyectó i.t. GFP (Grupo 4) de los días 15-19.

5

Asignaciones de grupos

| Grupo                    | Tratamiento  | N  |
|--------------------------|--------------|----|
| 1                        | Control: PBS | 2  |
| 2                        | Toca 511     | 10 |
| 3                        | Toca 621     | 5  |
| 4                        | Vector GFP   | 6  |
| Número total de animales |              | 23 |

*Vector.* Se inyectó Toca 511 y Toca 621 (50 µl) lentamente intratumoralmente usando una jeringa de insulina.

10 Se utilizó Toca 511 (que codifica el gen  $\gamma$ CD2 de la citosina desaminasa) de número de lote T511019-FNL para todos los animales del Grupo 2 y Toca 621 (que codifica interferón gamma de ratón) número de lote T621006 SEC se usó para todos los animales del Grupo 3. Este material se produjo usando el mismo proceso usado para el material de ensayo clínico, pero no se hizo de acuerdo con cGMP.

15 Toca 511 número de lote T511019-FNL tenía un título de 4,7E8 UT / ml.

Toca 621 número de lote T621006 SEC tiene un título de 2,8E8 UT / ml.

MLV-GFP (T5.0006) es el número de lote TGFP004-FNL con un título de 9,0E7 UT/ml.

20

Los tumores a los que se inyectó Toca 621 mostraron una disminución ( $p = 0,0016$ ) en el crecimiento tumoral en comparación con los tumores inyectados con Toca 511 (Figura 15). En un animal de la inyección Toca 621 desapareció el tumor. Un análisis posterior mostró que los genomas podrían detectarse en algunos de los tumores Toca 511 y Toca 621 hasta 24 días después de la inyección. Uno de los dos explantes de los tumores inyectados con Toca 621 tenían una secreción detectable de IFN $\gamma$  (18,8pg / ml) mediante ELISA.

25

**Ejemplo 15. Velocidad de propagación viral de GFP en un modelo de xenoinjerto subcutáneo U-87 en ratones desnudos, usando el vector GFP de una línea productora estable.** Determinar la velocidad de propagación viral basándose en una única administración del vector  $3e5 / 100 \mu l$  en xenoinjertos U-87 establecidos, determinando el porcentaje de las células que expresan GFP en diversos puntos temporales, en un modelo subcutáneo de un tumor en ratones desnudos.

30

*Descripción del estudio.* Un total de 5 ratones (ID n.º 71 a n.º 75) se sometieron a implante en el flanco dorsal derecho e izquierdo de 2e6 células U-87 administradas s.c. el día 0. Al día 13 se inyectó el tumor dorsal derecho de cada ratón con T50006 purificado (vector GFP)  $3 \times 10^5$  UT / 100 µl hechas a partir de un grupo productor de HT1080 construido como se ha descrito anteriormente, y purificado como se describe en el ejemplo YYY. El mismo día se sacrificó al animal de ID N.º 71; se sacrificó a los animales de ID n.º 72, ID n.º 73, ID n.º 74 e ID n.º 75 los días 5, 9, 12 y 26 después de la inoculación del vector, respectivamente. Se extirparon los tumores y se procesaron para análisis FACS de GFP. Los resultados se muestran en la figura 16 y muestran un aumento constante en el % de células positivas de GFP con el tiempo, lo que indica la propagación del vector en este modelo.

40

En el presente documento se describen las siguientes cláusulas:

45

1. Una línea celular productora de retrovirus para la producción de una partícula de retrovirus competente para la replicación, comprendiendo la línea celular una línea celular de fibrosarcoma, una de osteosarcoma o una de timoma, dicha línea celular expresa de forma estable un genoma retroviral recombinante que comprende un gen *gag*, un gen *pol*, un gen *env*, polinucleótido heterólogo y el factor *psi* retroviral ( $\Psi$ ) para el ensamblaje del genoma retroviral recombinante.

50

2. Una línea celular productora de retrovirus de la cláusula 1, donde la partícula de retrovirus competente para la replicación se expresa de forma estable.

3. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 2, donde la semivida es mayor de 7 días a 2-8 °C.

55

4. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 2, donde el vector producido es aproximadamente estable al 100 % durante 3 meses o más y el mismo vector producido a partir de una línea celular transfectada transitoriamente con el virus competente para la replicación pierde al menos cinco veces la actividad en 2 a 8 semanas en las mismas condiciones de almacenamiento, en comparación con los títulos iniciales.

5. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 1, donde el retrovirus competente para la replicación comprende: una proteína GAG retroviral; una proteína POL retroviral; una envoltura retroviral; un polinucleótido

- retroviral que comprende secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico gag, un dominio de ácido nucleico pol y un dominio de ácido nucleico env; un casete que comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o un dominio de ácido nucleico regulador unido operativamente a un polinucleótido heterólogo, donde el casete se sitúa en 5' de la LTR en 3' y en 3' del dominio de ácido nucleico env que codifica la envoltura retroviral; y secuencias de acción en *cis* necesarias para la transcripción inversa, el empaquetado y la integración en una célula diana, donde el RCR mantiene una mayor competencia de replicación después de 6 pases, en comparación con un vector PACE.
- 5 6. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la secuencia polinucleotídica retroviral deriva del virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) o el virus de la leucemia de gibón (GALV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous, el virus de la leucemia de gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV) y el virus felino RD114.
- 10 7. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5 o 6, donde el MLV es un MLV anfitriónico.
- 15 8. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 1, en donde el retrovirus es un gammaretrovirus.
9. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la secuencia promotora está asociada con un gen regulador del crecimiento.
10. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la secuencia promotora comprende: una secuencia promotora específica de tejido.
- 20 11. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 10, donde la secuencia promotora específica de tejido comprende al menos un elemento de respuesta a andrógenos (ARE).
12. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 11, en donde el elemento de respuesta a andrógenos deriva de un promotor de probasina.
- 25 13. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 10, donde la secuencia promotora específica de tejido comprende un promotor de probasina.
14. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el promotor comprende un promotor del CMV que tiene una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de una o más bases de ácido nucleico y que es capaz de dirigir e iniciar la transcripción.
- 30 15. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el promotor comprende una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 582.
16. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el promotor comprende un polinucleótido de dominio CMV-R-U5.
- 35 17. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 16, donde el dominio CMV-R-U5 comprende el promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano unido a una región R-U5 de MLV.
18. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 17, donde el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 hasta aproximadamente el nucleótido 1202 o secuencias que son al menos un 95 % idénticas a una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22, donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la misma.
- 40 19. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la gag del polinucleótido deriva de un gammaretrovirus.
20. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 19, donde el dominio de ácido nucleico gag comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 hasta aproximadamente el nucleótido 2819 de SEQ ID NO 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % con la misma.
- 45 21. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el dominio pol del polinucleótido deriva de un gammaretrovirus.
22. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 21, donde el dominio pol comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 hasta aproximadamente el nucleótido 6358 de SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 % de identidad con la misma.
- 50 23. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el dominio env comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 hasta aproximadamente el nucleótido 8323 de SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos una identidad del 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % con la misma.
- 55 24. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el IRES deriva de un virus de encefalomiocarditis.
25. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 24, donde el IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 8327 hasta aproximadamente el nucleótido 8876 de SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 % o 99 % de identidad con la misma.
- 60 26. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el ácido nucleico heterólogo comprende un polinucleótido que tiene una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 3, 5, 11, 13, 15 o 17.
27. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido que comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 4.
- 65 28. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el ácido nucleico heterólogo está optimizado por codones humanos y codifica un polipéptido como se establece en la SEQ ID NO: 4.
29. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el ácido nucleico heterólogo comprende una

- secuencia como se establece en SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido número 8877 hasta aproximadamente 9353.
30. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 29, donde la LTR 3' deriva de un gammaretrovirus.
31. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 30, donde la LTR 3' comprende un dominio U3-R-U5.
- 5 32. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 31, donde la LTR 3' comprende una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido número 9405 hasta aproximadamente 9998 o una secuencia que es al menos un 95 %, 98 % o 99,5 % de identidad con la misma.
33. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el polinucleótido retroviral comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22.
- 10 34. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un modificador de respuesta biológica.
35. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 34,, donde el modificador de respuesta biológica comprende una citocina inmunopotenciadora.
- 15 36. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 35, donde la citocina inmunopotenciadora se selecciona del grupo que consiste en interleucinas 1 a 15, interferón, el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF).
37. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 35, donde la citocina inmunopotenciadora es interferón.
- 20 38. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 37, donde el interferón es interferón gamma.
39. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido que convierte un profármaco no tóxico en un fármaco tóxico.
40. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 39, donde el polipéptido que convierte un profármaco no tóxico en un fármaco tóxico es timidina quinasa, purina nucleósido fosforilasa (PNP) o citosina desaminasa.
- 25 41. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica el resto diana.
42. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 41, donde el resto diana comprende un antígeno de cáncer.
43. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica un dominio de unión.
- 30 44. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 43, donde el dominio de unión comprende un dominio receptor, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
45. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 5, donde la secuencia de ácido nucleico heterólogo comprende un polinucleótido inhibidor.
- 35 46. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 45, donde el polinucleótido inhibidor comprende una secuencia de ARNi o ARNic y donde el dominio de ácido nucleico regulador es un promotor.
47. El retrovirus producido por una línea celular productora de retrovirus de cualquiera de las cláusulas 1-45 donde la línea celular productora deriva de una línea celular HT1080, D17, Cf2 o 293.
48. Un retrovirus producido por la línea celular productora de retrovirus de una cualquiera de las cláusulas 1-47.
- 40 49. Una preparación sin células que comprende partículas virales obtenidas de la línea celular productora de retrovirus de una cualquiera de las cláusulas 1-47.
50. La preparación sin células de la cláusula 46 que comprende ascorbato.
51. Un método de producción de un vector que produce una línea celular de la cláusula 1 que comprende: transformar una línea celular 293 con un plásmido que codifica un vector retroviral que comprende, de 5' a 3': una fusión CMV-R-U5 del promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano a la región R-U5 de MLV; un PBS, sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme en 5'; señal de empaquetamiento  $\psi$ ; una secuencia codificante de gag para el antígeno específico del grupo MLV; una secuencia codificante de pol para la poliproteína de polimerasa del MLV; un sitio de corte y empalme en 3'; una secuencia codificante de env de 4070A para la proteína de la envoltura de la cepa 4070A de MLV; un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis o un dominio regulador del ácido nucleico;
- 45 una secuencia codificante de la citosina desaminasa modificada; una tira de polipurina; y una repetición terminal larga de U3-R-U5 de MLV; cultivar la célula 293 para producir partículas víricas; aislar las partículas víricas; infectar una línea celular HT1080 con las partículas víricas, proporcionando de este modo la línea celular productora de partículas víricas.
- 50 52. La línea celular producida mediante el método de la cláusula 51.
53. Un método para producir una composición para terapia génica que comprende cultivar la línea celular de la cláusula 51 para producir partículas virales y purificar sustancialmente las partículas virales.
54. Un banco celular que comprende la línea celular de la cláusula 51.
55. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 1, cultivada en suspensión.
56. La línea celular productora de retrovirus de la cláusula 1 o 55 cultivada en medio sin suero.
- 60 57. Una composición farmacéutica que comprende una partícula retroviral aislada del cultivo de una línea celular productora de la cláusula 51.

**REIVINDICACIONES.**

1. Una partícula de retrovirus competente para la replicación producida por una línea celular HT 1080 que se cultiva en medio sin suero y en suspensión, en donde dicha línea celular HT 1080 expresa de manera estable un genoma retroviral recombinante que comprende un gen *gag*, un gen *pol*, un gen *env*, un polinucleótido heterólogo y un factor *psi* retroviral ( $\Psi$ ) para el ensamblaje del genoma retroviral recombinante, en donde la partícula de retrovirus competente para la replicación comprende el genoma retroviral recombinante, y en donde la línea celular HT 1080 se ha adaptado para el cultivo en medio sin suero y en suspensión.
2. La partícula de retrovirus competente para la replicación de la reivindicación 1, en donde el retrovirus es un gammaretrovirus.
3. La partícula de retrovirus competente para la replicación de la reivindicación 1, en donde el retrovirus competente para la replicación comprende:
- una proteína GAG retroviral;
  - una proteína POL retroviral;
  - una envoltura retroviral;
  - un polinucleótido retroviral que comprende secuencias de repetición terminal larga (LTR) en el extremo 3' de la secuencia polinucleotídica retroviral, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retroviral, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico *gag*, un dominio de ácido nucleico *pol* y un dominio de ácido nucleico *env*;
  - un casete que comprende un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o un dominio de ácido nucleico regulador unido operativamente a un polinucleótido heterólogo, donde el casete se sitúa en 5' de la LTR en 3' y en 3' del dominio de ácido nucleico *env* que codifica la envoltura retroviral; y
  - secuencias de acción en *cis* necesarias para la transcripción inversa, el empaquetado y la integración en una célula diana.
4. La partícula de retrovirus competente para la replicación de la reivindicación 3, en donde la secuencia de polinucleótidos retroviral deriva del virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) o el virus de la leucemia de mono de gibón (GALV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous (RSV), el virus de la leucemia de gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV) y el virus felino RD114, preferentemente en donde el MLV es un MLV anfitriónico.
5. Un método de producción de la partícula retroviral competente para la replicación de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:
- transformar una línea celular 293 con un plásmido que codifica un vector retroviral que comprende, de 5' a 3':
- una fusión CMV-R-U5 del promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano a la región R-U5 de MLV;
  - un PBS, sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa;
  - un sitio de corte y empalme en 5';
  - señal de empaquetamiento  $\psi$ ;
  - una secuencia codificante de *gag* para el antígeno específico del grupo MLV;
  - una secuencia codificante de *pol* para la poliproteína de polimerasa del MLV;
  - un sitio de corte y empalme en 3';
  - una secuencia codificante de *env* de 4070A para la proteína de la envoltura de la cepa 4070A de MLV;
  - un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis o un dominio regulador del ácido nucleico;
  - una secuencia codificante de la citosina desaminasa modificada;
  - una tira de polipurina; y
  - una repetición terminal larga de U3-R-U5 de MLV;
- cultivar la célula 293 para producir partículas víricas;
- aislar las partículas víricas;
- infectar una línea celular HT1080 con las partículas víricas, proporcionando de este modo una línea celular HT1080 productora de retrovirus que produce partículas de retrovirus competentes para la replicación; y
- adaptar la línea celular HT180 productora de retrovirus para crecer en medio libre de suero y en suspensión, cultivar la línea celular adaptada en medio sin suero y en suspensión para producir partículas virales, y purificar sustancialmente las partículas virales.

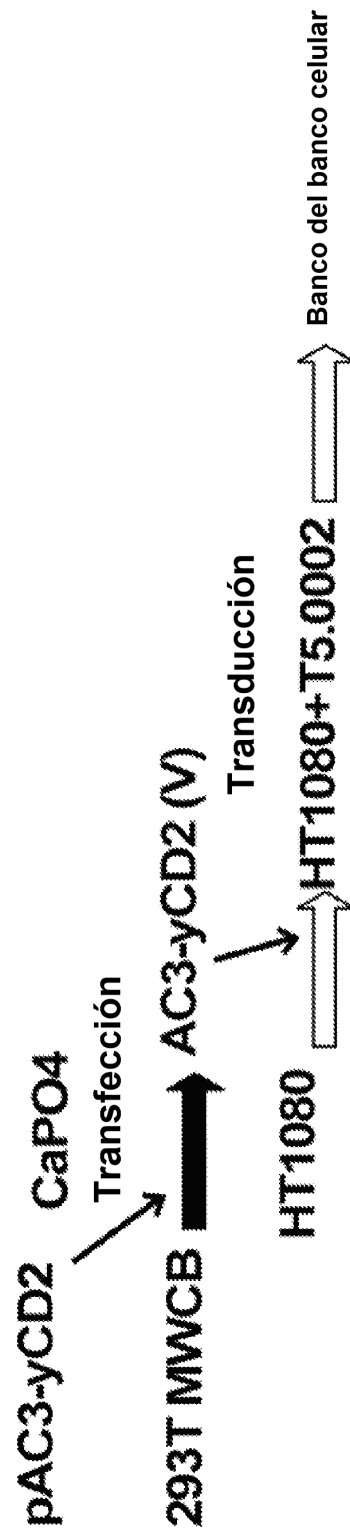
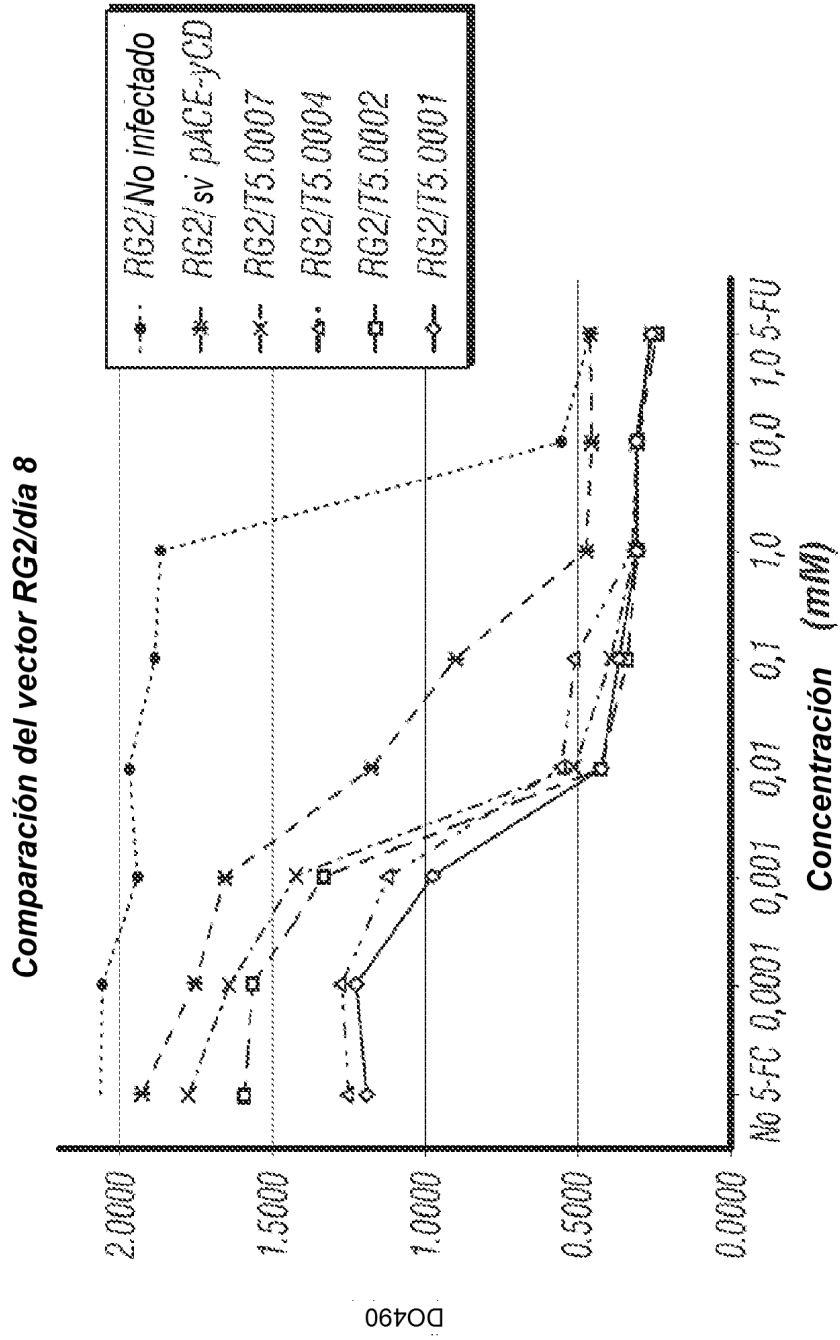


FIGURA 1





| Ref. leyenda | Nombre de la referencia | Nombre original     | Otros nombres | Promotor LTR5' | Envoltura    | Vector   | RES  | Transgén          | 3'LTR  | Notas                               |
|--------------|-------------------------|---------------------|---------------|----------------|--------------|----------|------|-------------------|--------|-------------------------------------|
| 75.0001      | pAC3-FCO1               | CDqul secuencia     |               | CMV            | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura    |        | hu codón                            |
| 75.0002      | pAC3-FCO2               | CDopt+3ot           |               | CMV            | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura    |        | hu codón + 3ot mutaciones           |
| 75.0003      | pAC3-FCO-U              | CD-OPRT             |               | CMV            | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura    |        | hu codón + 3ot mut OPRT fusión      |
| 75.0004      | pAC3-FCO2-0             | CDopt+3ot-OPRT      |               | CMV            | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura    |        | hu codón + 3ot mut OPRT fusión      |
| 75.0005      | pAC3-FCO2-10            | CDqul+3ot-LINK-OPRT |               | CMV            | Anfo (40704) | pAC3-erm | EMCV | CD de levadura    |        | hu codón + 3ot mut-LINK-OPRT fusión |
| 75.0006      | pAC3-EGFP               | pACE-erm            | pACE-GFP      | CMV            | Anfo (40704) |          | EMCV | GFP esmeralda     | MLV U3 | GFP esmeralda                       |
| 75.0007      | pAC3-FCO                | pAC3-FCO            |               | CMV            | Anfo (40704) |          | EMCV | CD de levadura sv | MLV U3 |                                     |

FIG. 2 (Cont)

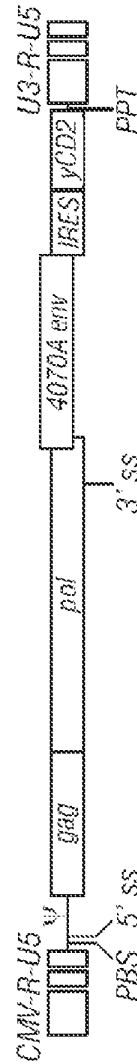


FIG. 3A

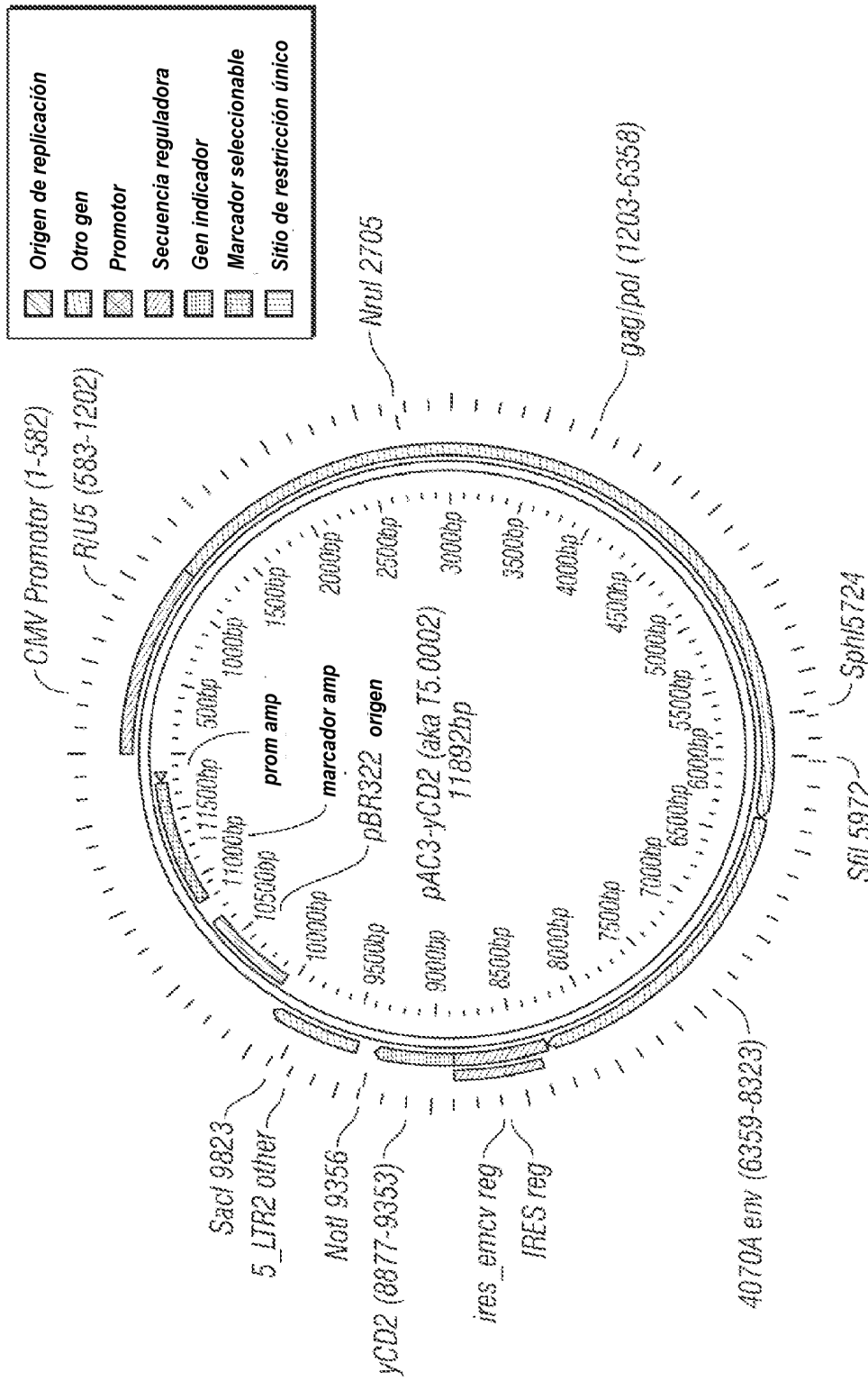


FIG. 3B

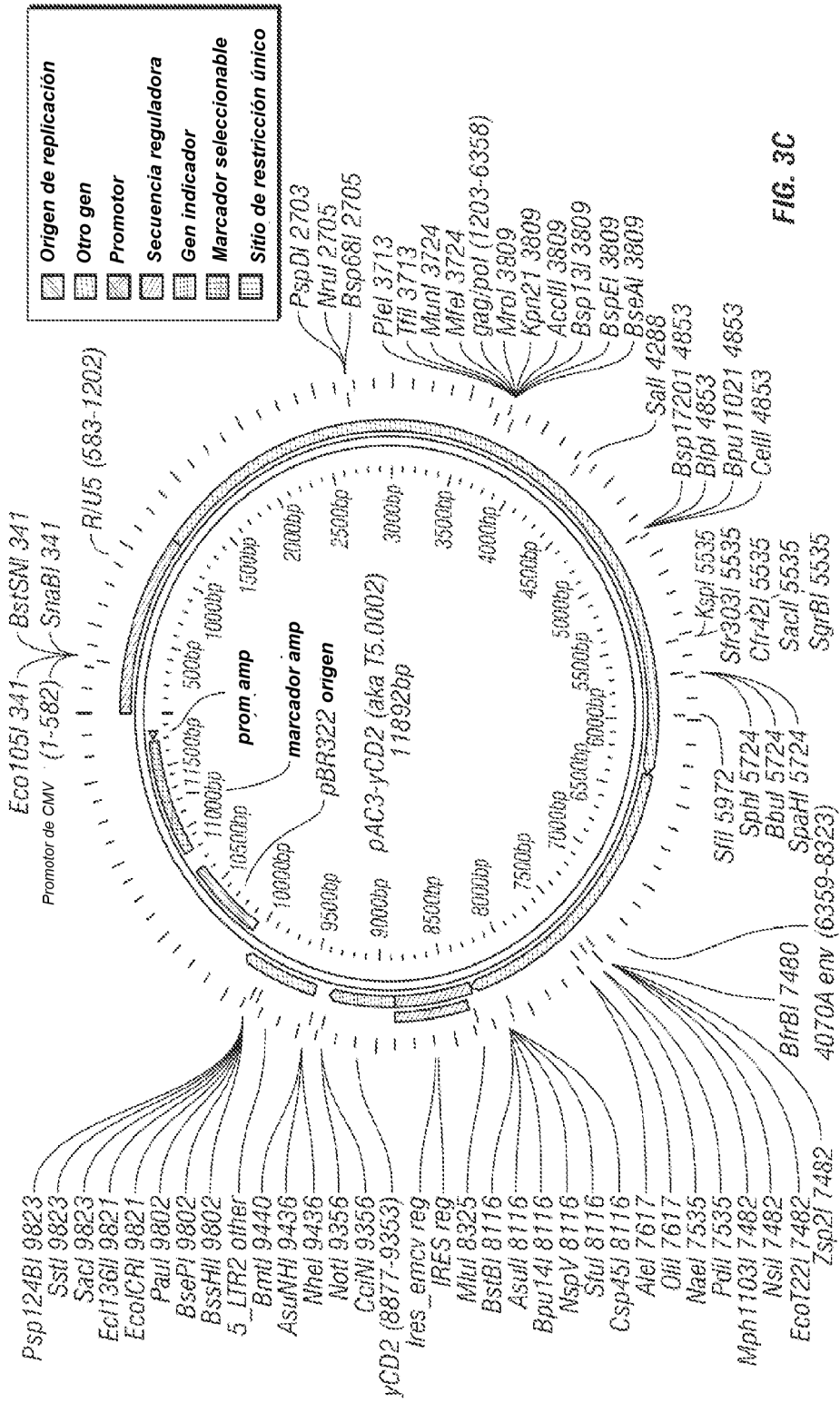


FIG. 3C

TAGTTATTAATAGTAATCAATBRGGGGTCATTAGTTCAIRGCCCATATATGGAGTTCCGGCTTACHTAATTTACGGTAAAT  
GGCCCGCCCTGGCTGACCCGCCAAGCACCACCAGCCCTTTGACGTCATAAATGACGTTATGTTCCATAGTAAAGCCAAATAGGGA  
CTTTCATTTGACGTCATGCGTGGASTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAATGCCAAGTAC  
GCCCCATTTGACGTCATGACGCTAAATGGCCCGCTTGGCATTATGOCACGTACATGACCTTATGGSACTTTCTACTTGG  
CAGTACATCTAGCTATTAGTCTATGCTATTAACATGGTGTATGGGTTTGGCAGTACATCAATGGGCTGGATAAGGTTTG  
ACTCAGGGGATTTCCAGCTCTCCACCCATTTGACGTCATGGGATTTGTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAA  
ATGTCGTAAACAATCAGCCCATTTGACGCAATGGCCGTAGCCGTGTACGGTGGGAGTCTATATAAGCAGAGTGGTTTA  
GTGAACCGCCGACGCTCTCCATTTGACTGASTGCCCGGTTACCCGTGTATCCATAAACCTCTTGCATTTGCATCCGAC  
TTGTGCTCTGCTCTTCCCTGGGAGGGTCTCTCTGASTGATTGACTACCCCTCAGCCGGGGTCTTTTCATTTGGGGCTCTGT  
CCGGATCGGGAGACCCCTGCCACGGGACCAACGACCCACCCCGGAGCTTAACTGGCCAGCACTTATCTGTGTCTGTCC  
GATTTGCTAGTGTCTATGACTGATTTTATGGCCCTGCTCGGTACTAGTTAGCTAAGTACTAGCTCTGTATCTGGGGACCGGTG  
GTGGAACCTGACGAGTTCGGAACACCCGGCCGTAACCTGGGAGAGCTCCACGGACTTCGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGAC  
CTGAGTCCAAAATCCCGATCTTTTGGACTCTTTGGTGCACCCCCCTTAGAGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGA  
GAACCTAAACAGTTCGCCCTCCGCTGTGAATTTTGTCTTGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCCGGGCTTTGCTGCTGC  
AGCATGTTCTGTGTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAGAATATGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAA  
GTTTGACCTTAGCTCACTGGAAGAATGTCGACGGATCGCTCACAACAGTGGTATGTCAGAAGAGACGTTGGTTAC  
CTTCTGCTCTGAGAAATGGCCAGCTTTAAGCTGGATGGCCGGAGAGGCACTTTAAGCCGAGACTCATCACCCAGTT  
AAGATCAAGGCTTTTTCACCTGGCCGATGACACCCAGACAGGTCCTCCACATGCTGACTGGGAGCCCTTGGCTTTTG  
ACCCCTCCCTGGCTCAAGCCCTTTGTACACCTAAGCCCTCCGCTCTCTCTCCATCCGCCCCGCTCTCTCCCCCTTGA  
ACCTCCTGTTGACCCCGCTGGATCTCTCTTTATCCAGCCCTCACTCTCTCTAGGGCCAAAACCTAAACCTCAAGTT  
CTTCTGACAGTGGGGGGGCTCTCTCTACCTACTTACAGAAGACCCCTCCGCTTATAGGGAACCCAGACCCACCCCTTCCG  
ACAGGACCGAAATGCTGGAGAAAGCCCTGGGGAGAGGACCCGACCCCTCCCAATGGCATCTGGCTTACGTTGGAG  
ACGGGAGCCCTGTGGGCACTCCACTACCTGGCAGGATTCCTCCCTCCGCGAGGAGAAACGGACAGTTCAATACTGG  
CCGTTCTCTCTCTGACCTTTACAACTGGAAAATAATAACCTTCTTTTCTGAGATCCAGGTAACCTGACAGCTCTGA  
TGGAGTCTGTTCTCATCACCCATCACCCACCTGGGACGACTGTCAGCAGTGTGGGACTCTGCTGACCGGAGAGAAAA  
ACAACGGTGTCTTAGAGGCTAGAAAAGCGGTGGGGGGGATGATGGGCGCCCACTCAACTGGCCATGAAATCGATGCC  
GCTTTTCCCTCGAGCCCGGACTGGGATTAACACCACCCAGGTTAGGAACCACTTAGTCCACTATCGCCAGTTGCTCC  
TAGCCGCTCTCCAAAACCTGGGAGAGCCCCACCAATTTGGCCAGGTTAAAAGAAATAACACAAGSGCCCAATGACTCTCC  
CTCGGCTTCTTAGAGGACTTAAGGAAGCCTATCGCAGGTACACTCTTATGACCTGAGGACCCGAGGCAAGAACTAAT  
GTGCTATGCTTTTCAATTTGGCAGTCTGCCCCAGACATTTGGGAGAAAGTTAGAGAGGTTAGAAATTTAAAAAACAAGAGGC  
TTGGAGATTTGTTAGAGAGGCAAGAAAGATCTTTAATAACAGAGAACCCCGAAGAAAGAGAGGAGGCTATCAGGAGAGA  
AACAGAGGAAAAGAAAGCCCTAGGACAGAGGATGAGCAGAAAGCAAAAGAAAGATCTTAGGAGACATAGAGAGATC  
AGCAAGCTATTGGCCACTGCTCTTACTGGACAGAAACAGGATAGACAGGGAGGAGACAGAGGAGGTTCCAACTCGATCGG  
ACCACTGTGCTACTGCAAGAAAAGGGCACTGGGCTAAAGATTTGTCUCAAAGAAACUACAGGACCTCGGGGACCAAGACC

promotor de CMV

R  
U5  
GT = 5'ss

gag

FIGURA 3D

CCAGAGCTCCCTCCTGACCCCTAGATGACTAGGGAGGTCAAGGTCAAGAGCCCCCCCTGAAOCCAGGATAACCCCTCAAAGTC  
GGGGGCAACCCGCTCACCCTTCCCTGGTAGATACTGGGGCCCAACACTCCGTGCTGACCCAAATTCCTGGACCCCTAAGTGATA  
AGTCTGCCCTGGGTCCAAAGGGCTACTGGAGGAAAGCGGTATGCTGGACCACGGATCGCAAAGTACATCTAGCTACCGGTAA  
GGTCAOCCACTCTTTTCTCCATGTACCAGACTGTCCCTATCCTCTGTTAGGAAGAGATTTGCTGACTAAACTAAAAGGCCAA  
ATCCACTTTGAGGGATCAGGAGCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGACCCCTAAATATACRAGATG  
AGCATCGGTACATGAGACCTCAAAGAGCCAGATGTTCTCTAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCTGGG  
GGAAACCGGGGATGGGACTGGCAGTTGGCCAGGCTCCTCTGATCATACTCTGAAAGCAACCTCTACCCCGCTGCCATA  
AAACATAACCCATGTCAACAGAACCCAGACTGGGGTCCAGGCCACATACAGAGACTGTGGACCAAGGGAATACTGGTAC  
CCTGCCAGTCCCCCTGCAACACCCCTGCTACCCGTTAAGAAAACAGGGACTAATGATTAAGCCCTGTCCAGSATCTGAG  
AGAAGTCAACAAGCGGTGGAAGACATCCACCCACCCGTGCCAACCTTACACCTCTTGAGCGGGTCCACCGTCCAC  
CAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCCTTTTCTGCTHAGAATCCACCCACCACTCAGCCTCTCTCGCTTTG  
AGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAGGACAAATGACCTGGACCAAGACTCCACAGGGTTTCAAAGACAGTCCACCC  
GTTTGATGAGGCACTGCACAGACCTAGCAGACTTCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTACGTTGGATGAC  
TTACTGCTGGCCGCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTCGGGCCCTGTEACAAACCTTAGGAAOCCCTGGGTATC  
GGGCTTCGGCCAAAGAAAGCCAAATTTGCCAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTCTAAAGAGGGTCAAGATGGCT  
GACTGAGGCCAGAAACAGACTGTGATGGGGCGCTACTCCGAGACCCCTCGACAACTAAGGATTCCTAGGGAAGGCA  
GGCTTCTGTGGCTCTGGATCCCTGGGTTTCAGAAATGGGACCCCTTGTACCCCTCACCAAAACGGGACTCTGTTA  
ATTTGGGGCCAGACCAACAAAGGCTATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTCTAACCTGCCCCAGCCCTGGGGTTGCCAGATT  
GACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTUGACAGAAAGGAGCTACGGCAAGGTGTCTAACGCCAAAACCTGGGACTTTGGGT  
CGGCGGTGGCTAOCCTGTCCAAAAGCTAGACCCAGTACAGCTGGGTGGCCCTTGCCTAGGGATGGTAGCAGCCATTG  
CCCTACTGACAAAGGATGCAAGCCAGGTAACCATGGGACAGCACATGCTATTCTGGCCCCCATGCASTASAGGCACTAGT  
CAAACAAACCCCGACCGCTGGCTTTTCCAAAGCCCGGATGACTCACTATCGGGCTTGGCTTTGGACACGGACCGGTCCAG  
TTGGGACCGGTGCTAGCCCTGAACCCGGCTACCTGCTCCCACTGCTHAGGAAGGGCTGCACACAACTGCTTERTATCC  
TGGCCGAAACCCACGGAAOCCGACCCGACCTAACGGACACGCCCTCCAGACGCCGACACACCTGTTACACGGAATGGAAG  
CAGTCTCTTACAAGAGGGACAGCCTAAGGCCGGACCTCGGTCACACCGAGACCGAGGTAATCTGGGCTAAAGCCCTGCCA  
GCCGGACATCCGCTCAGCGGGTGAAGTATAGCACTCACCCAGGCCCTAAAGATGGCAGAGGTAAGAACTAAATGTTT  
ATACTGATAGCCGTATGCTTTTCTACTGCCATATCCATCGAGAAATATACAGAGGCCCTGGGTTGCTCACAACAGAGG  
CAAACAGATCAAATAAAGACAGATCTTTGGCCCTACTAAAGGCCCTCTTTCTGCCAAAAGACTTAGCATAAATCCATTGT  
CCAGGACATCAAAGGGACACAGCGCGGAGCTAAGGGCAACCGGATGGCTGACCAAGGGCCCGAAAGGCAGUCATCAG  
AGACTCAGACACCTCTACCCCTCTCATAGAAAATCATCACCCCTACACCTCAGAACATTTTCATTAACCACTGACTGATAT

[pb]

FIGURA 3D (Cont.)

AAAGGACCTAACCAAGTTGGGGGOCATTTATGATAAACAAGAAAGTATTGGGTCACCAAGGAAAACCTGCTGATGCOOTGAC  
CAGCTTACGTTTGGAAATATAGACCTTCTTCACTCAGCTGACTCACCTCAGCTTCACAAAATGAAAGGCTCTCCTAGAGAGAA  
GCCACAGTCCCTACTACATGCTGACCCGGGATCGAGACCTCAAAAATAATCAGCTGAGACCTGCAAAAGCTTCTGCAAGTCAA  
CGCCAGCAAGTCTGGCCCTAAACAGGGAACTAGGGTCCCGCGGCAATCGCCCTGGCACATCTGGGAGATCCGATTCACCGAG  
ATAAAAGCCCGGATTTGCTATAAAATATCTTCTAGTTTATATAGATACCTTTCTGGCTGGATAGAAAGCTTCCCAACCA  
AGAAAGAACCCCAAGCTCTAACCAGCAAGCTACTAGAGGAGATCTTCCCGAGGTTCGGCAGTCCCTCAGGATTTGGCGAC  
TGACAAATGGGCTGCTTCTCCAAAGGTGAGTTCAGACAGTGGCCGATCTGTTGGGGATTGATTGGAAATTAACATTTGCA  
TACAGRCCCAAGGCTCAGGCCAGGTAGAAGAAATGAAATAGAACATCAGAGGAGACTTAACTAAATTAACGCTTGGCAACTG  
GCTTAGAGACTTGGTCTCTACTCCCTTAGCTCTGACCGAGCCGCAACACGCTGGGCTCCCGCTTGGCTTCCACCCATA  
TGAGATCTTATATCGGGCACCCCGCCCTTCTAAACTTCCCTCAACCTGACATGACAGACTTACTAAGCAGCCCTCTCTC  
CAAGCTCCTACTACAGGCTCTACTTACTTACTCAGCAGCAAGTCTGGAGACCTCTGGCGCAGCTTACCAAGAACACTTGGACC  
GACCGGCTGCTACTCAGCTTACCGAGTGGCGACAGTGTGGGTCGCGGACACCCAGACTAAGAACTTAGAACCTTGGCTG  
GAAAGGACCTTACACAGTCTCTGCTGACCCACCCCAACCGCCCTCAAAGTAGACGGCTTGGAGCTTGGATACAGCGCCGAC  
GTGAAGGCTGCGACCCCGGGGCTGGACCATCTCTAGACTGACCTGGCGCTTACAGCTCTCAAACCCCTCAAGATAA  
GATTAACCGGTGAAGCCCTTAATAGTCACTGGGAGCTCTGTTAGGAGTAGGGATGGCAGAGAGCCCTCATCAGGCTTTTAAAT  
GTAACCTGGAGACTCACCAACTGATGACTGGGGTACCGCCAAATGCCACCTCCCTCTGGGACTGTACAGATGCOCTTCC  
CAAAATTAATTTTGGATCTATGAGATCTGGTGGGAGGAGGAGTGGGACCTTCAGACCCAGGAACTGATGTTGGGATGGCTG  
CAAGTCCCGCGAGGAGACAGCGGACCCCGACTTTTGACTTTTACGTTGGCTCTGGGATACCGTAAAGTCCGGGCTGGG  
GGACAGGAGACGGCTACTCTGGTAAATGGGGTGTCAAAACCACTGGACAGCTTACTGGAAAGCCACATCATCTGGGAC  
TAATCTCTCTTAAAGCCGGTAAACCCCTGGGACAGGGATGCTCTAAAGTTGCCCTGGCTCCCTGCTACGACTCTCTCAA  
AGTAATCAATCTCTTCAAGGGGCTACTCTGAGGGGCGAGATCAAAACCTCTAGTCTTACATTCAGTCTCAGGAAAGAAAG  
GCTAACTGGGACGGCCCAAAATCTGGGGCTGAGACTGTACCGGACAGGAAACAGATCTTATACATGTTCTCTCCCTGACCC  
GGCAGGCTCTTAAATGGGGTCCCAAGCCACTAGCCCTCCCAATACAGTATACCCCTCTTCCACTACAGTACACCTTCAACCTCC  
CTTACAGTCCAAGTCTCTACAGCCACTCCCGGACTGGAGATAGACTACTAGTCTTCTAGTCAAAGGAGCCCTATCAGGCTCC  
TTAACTCACCAAATCCGACAGACCCCAAGAAATGTGGCTGTCTTACTAGTCTGGGACCTTCTTATTACGAAAGGATGGCGT  
CGTGGGACTTATACCAATCATCTCCCGCTCCCGGCAACTGTACGGCCACTTCCCAACATAAGCTTACCTATCTGAAAGT  
ACAGGACAGGGCTATGCTATGGGGCAGTACTTAAACTTCAACAGGCTTATGTAACACCCCAAGCGCCGCTCTGGAT  
CTACTACTTTCAGCACCCCGGAAACAAGTGGGCTTGCACCACTGGATTTGACTCCCTGCTTGCACCAAGGCTCTCAA  
CTCAACACAGATTTATGTTAGTTAGTTCAACTCTGCCCACAGTAAATTTACACTCCCGGATATATGATGTTGCTAGCTT  
GAAAGGCTTACCAAAATAAAAGACACCCAGTATCACTTACCCTTGGCTTCTACTAGCAGATTAACCATGGGAGGCTTTC  
CAGCTGGAAATAGGACGGGACCCAGCTTAAATTAAAACCCAGCAGTTTGGAGCTTCACTCCCGTATCCAGACACACT  
CAACGAGTCAAAAAGTCAATTAACCACTTAAAGAGTCACTGACCTCTGTTGCTGAGTACTCTTACAGAACCCGACAGGC  
CTAGATTTGCTATTTCTAAAGGAGGGAGGCTCTGCGGACCTTAAAGAAAGAAATGTTGTTTTTATGACAGCCACAGGGG  
TAGTGGAGACAGCAGTGGCCAAATTAAGAGAAAGGCTTAAATCAGAGACAAAACCTATTTGACACAGCCAGGATGGTTCG  
AGGCTCTTTAATAGATCCCTGCTTACCACTTACTCTCCACATCATGGACCTCTAATAGTACTCTTACTGATCTTA  
CTTTTGGACTTTCATTTCTCAAATGATTTGGCCAAATTTCTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGCTCTGTTTGGTTCGAC  
AGCAATATCACCCAGCTAAACCCATAGAGTACAGCCATGACCCGTTACTGGCCGAGCCCTTCCATTAAGGCCGCTG  
CGTTGCTCTATATTTATTTTCCACATAATGGCTTTTGGCAATGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGCTCTTTGAC  
GAGCATCTTACGGGCTTTTCCCTCTCGCCAAAGCAATGCAAGCTCTGTTGAATGCTGTAAGGAAAGCACTTCTCTGAA  
GCTCTTGAAGACAAACAGCTCTGAGCCACTTTTCCAGGACAGCGAACCCCTCCACTGGGACAGGCTGCTCTGCGGCT  
AAAAGCCAGTGTATAGATACCTTGCAAAGGGGACAAACCCAGTGGCAGCTTGGAGTGGATAGTGTGGAAAGAGT  
CAATGGCTCTCTCAGGCTATTTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAGGTAACCCATTTGATGGGATCTGATCTGGGG  
CTCTGGTGCATGCTTTACATGTTTGTGCGAGTTAAAABACSTCTAGGCCCCCGAACCCAGGGGACGTTGGTTTCC  
TTTGAAAAACAGCTTATAAATGCTGACCCCGGGATGGCTCTCAAGTGGATCAAAAAGGCAATGGATATCTCTTACAGCA  
GGCTCTGCTGGCTTACAGGAGGGCTGGCTGCTTCTGATCAACACAGGACGGCAGTCTCTTGGGACG  
GGCCACAACATGAGTTCACAGGGCTTCCCGCACCTCTGACCGGAGATCTCCACCTGGACACTCTGGCAGCTGGAGG  
GCAAGGCTGACAGGACACCCCTCTGACACCCCTCTGCTCTGACATGTTGACCTGGGCTTACATGATGATGAGGAT  
CCCTAGGCTCTGCTGGGACAGCTGAACTTCAAGTCCAAAGGGGAGAGTACCTCAAAACAGGGCCACAGGCTGGT  
GTTGTTGAGGCTGATGAGGCTGATGAGGAGCTTCAATGACGAGGAGGCTCAGGACTGGTTCGAGGAAATCGGGG

AGI = 3'as

4070A env1

Sub1

SMCV IRES1

P51F

yCD2

FIGURA 3D (Cont.)

# ES 2 718 546 T3

Promotor de CMV (1-582)>>>

1 TAGTTAATTAATAGTAAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG 60  
ATCAATAAATTAATCATTAGTTAATGCCCCAGTAATCAAGTATCGGGTATATACCTCAAGGC

61 CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGGCCATT 120  
GCAATGTATTGAATCCCATTTACCGGGCGGACCGACTGGCGGGTTGCTGGGGCGGGTAA

121 GACGTCATAAATGACGTATGTTCCCATAGTAAAGCCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCA 180  
CTGCAGTTATTAATGACATACRAGGGTATCATTCGCGTTATCCCTGAAAGCTAACTGCACT

181 ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC 240  
TACCCACCTCAATAATGCCATTTGACGGGTGAACCCATGTTAGTTACATAGTATACGG

241 AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATCACGGTAAATGCCCGCCTGGCATTTATGCCAGTA 300  
TTCATGCGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACCGGGCGAACCATAATACGGGTAT

Eco105I  
|  
SnaBI  
|  
BstSNI  
|

301 CATCACCTTATGCGCACTTTCCTACTGCGCAGTACATCTACCTATTACTCATTCGCTATTAC 360  
GTACTGGAATACCCCTGAAAGGATCAACCGTCAATGTAGATGCATAATCAGTAGCGATAATG

361 CATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCAGCGGG 420  
GTACCACTACGCCAAAACCGTCATSTAGTTACCCGCACCTATCGCCAACTGAGTGCCCC

421 ATTTCCAAGTCTCCACCCCAATGACGTCAATGGCAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACG 480  
TAAAGGTTTACAGAGGTGGGTAACTGCAGTTACCCCTCAAACAAAACCGTGGTTTTASTTGC

481 GCACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATGACGCAAAATGGCGGTAGGCGTGT 540  
CCTGAAAGCTTTTACAGCAATGTTGAGCGGGGTAACTGCGTTTACCGCCATCCGCACA

Región R (583-650)>>>

541 ACCGTTGGGAGGTCTATATAAGCACAGCTGCTTTAGTGAACCGCCGCCACTCCTCCGATTG 600  
TGCCACCCCTCCAGTATATTCGTCTCGACCAAATCACTTGGCGGGTTCAGGAGGCTAAC

FIGURA 3E

ES 2 718 546 T3

05 región (651-1202)>>>

|

601 ACTGAGTCGGCCGGGTACCCGTTGATCCAAATAAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGT 660  
TGACTCAGCGGGCCCATGGGCACATAGCTTATTTGGGAGAACGTCACCGTAGGCTGAACA

661 GGTCTCGCTGTTCCTTEGGAGGGTCTCCTCTGAGTGAATGACTACCCGTACGCGGGGGTC 720  
CCAGAGCGACAAGGAACCCCTCCAGAGGAGACTCACTAATCTGATGGGCAGTCGCCCCAG

721 TTTCATTTGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCAGGGACCACCGACCACCA 780  
AAACTAAACCCCGAGCAGGCCCTAGCCCTCTGGGGACGGGTCCCTGGTGGCTGGGTGGT

5' SS (758)

|

781 CCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTCTCTGTCGGATTGCTAGTGTCTATGAC 840  
GGCCCTCCATTEGACCGGTCGTTGAATAGACACAGACAGGCTAACAGATCACAGATACGT

841 TGATTTTATGCGCCTGCGTCTGCTACTAGTTAGCTAAGTACTAGCTCTGTATCTGGCGACCCG 900  
ACTAAAATACCGCGACCCAGCCATGATCAATCGATTGATCGAGACATAGACCGCCGGGG

901 TGGTGGAACTGACGAGTTCGGAAACCCCGGCCCAACCCCTGGGAGACGTCGCCAGGGACTT 960  
ACCACCTTGACTGCTCAAGCCTTGTGGCCGGCGTTGGGACCTCTGCGAGGGTCCCTGAA

961 CGCGGGCCCTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCCAAAAATGCCGATCGTTTTGCACTCTTTG 1020  
GCCCCCGSCAAAAACACCGGGCTGGACTCAGGTTTTTAGGGCTAGCBAACCTGAGAAAC

1021 GTGCACCCCTCTTAGAGGAGCGATATCTGGTTCGTGGTAGGAGACGAGAACCYAAAACAGT 1080  
CNCCTGGGGGGAATCTCTCCCTATACACCAAGACCAATCCTCTGCTCTTGGATTTCTCA

1081 TCCCGCCTCCGTCTGAAFTTTTGGCTTTCGGTTCGGGACCGAAGCCGGCCGGCGGCTTG 1140  
AGGGCGGAGGCAGACTTAAAACCAAAAGCCAAACCCCTGGCTTCGGCGGGCGGGGAGAAC

1141 TCTGCTGCAGCATCGTCTCTGTCTCTCTCTCTGACTGCTTTTTCTGTATTTCTCTGAGA 1200  
AGACGACGTCCTAGCAAGACACACAGACAGACTSACACAAAGACATRAACAGACTCT

gag (1203, 2819)>>>

|

1201 ATATGGCCDAGACTGTTAACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACCTGGAAAGATGTCG 1260  
TATACCCGCTCTGCAATGCTGAGGGGAATTCRAACTGGATCCACTGACCTTTCTGACAGC

1261 AGCGGATGCTCACAACCAGTCCGTAGATGTCAGAGAGAGAGCTTGGGTTACCTTCTGCT 1320  
TCGGCTAGCGAGTGTGGTCTGACCCTCTACAGTTCTTCTCTGCAACCCATGGAGAGCGA

1321 CTGCAGATGGCCACCTTTAAGCTCGGATGGCCGGAGACCCACCTTTAACCCGACACC 1380  
GAGCTCTTACCGGTTGGAAATTCAGGCTTACCGGCGCTCTGCGGTTGGAAATGGCTCTGG

1381 TCATCACCCAGGTTAAGATCRAGGCTTTTTCACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCCGG 1440  
AGTAGTGGGTCCAAATCTAGTTCCAGAAAAGTGGACCGGGGCTACCTGTGGGTCTGGTCC

1441 TCCCTTACATGCTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGAACCCCTCCCTGGGTCAAGCCCT 1500  
AGGGGATGTAGCACTGGACCTTTGGAAACCGAAAACGGGGGGAGGGACCCAGTTGGGA

FIGURA 3E (Cont.)



ES 2 718 546 T3

1501 TTGTACACCCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCCTCCATCCGCCCGTCTCTCCCCCTTGAAC 1560  
AACATGTGGGATTCGGAGGCCGGAGGAGAAGGAGGTAGCCGGGGCAGAGAGGGGAACTTG

1561 CTCTCTGGTTTGGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGGG 1620  
GAGGAGCAAGCTFGGGGGGAGCTAGGAGGGAAATAGGTGGGGAGTGAGGAAGAGATCCGC

1621 CCAAACTTAAACCTCAAGTTCTTTCTGACAGTGGGGGGCCGCTCATCGACCTACTTACAG 1680  
GGTTTGGATTTGGAGTTCAAGAAAGACTGTCACCCCCGGGAGTAGCTGGATGAATGTC

1681 AAGACCCCCCGCTTTATAGGGAACCAAGACCACCCCTTCCGACAGGGACGGAAATGGTG 1740  
TTCTGGGGGGCGGAATATCCCTGGGTTCTGGTGGGGGAAGGCTGTCCCTGCCTTTACCCAC

1741 GAGAAGCGACCCCTGGGGGAGAGGCCACCGACCCCTCCCAATGGCATCTCGCTACGTG 1800  
CTCTTCGCTGGGGACGCCCTCTCGTGGCTGGGGAGGGGTACCGTAGAGCGGATGCAC

1801 GGAGACGGGAGCCCCCTGTGGCCGACTCCACTACCTCGCAGGCATTCCTCCCTCCGCGCAG 1860  
CCTCTGCCCTCGGGGACACCGGCTGAGGTGATGGAGCGTCCGTAAGGGGGAGGGCGGTC

1861 GAGGAACGGACAGCTTCAATACTGGCCCTTCTCCTTCTCTGACCTTTACAACCTGGA AAA 1920  
CTCCTTTGCCTGTGGAAGTTATGACCGGCAAGAGGAGAAGACTGGAAATGTTGACCTTTT

1921 ATAATAACCCCTCTTTTTCTGAAGATCCAGGTA AACTGACAGCTCTGATCGAGTCTGTTC 1980  
TATTATGGGAAGAAAAGACTTCTAGGTCATTTGACTGTGAGACTAGCTCAGACAAG

1981 TCATCACCCATCAGCCACCTGGGAAGACTGTGAGCAGCTGTTGGGGACTCTGCTGACCG 2040  
AGTAGGGGTAGTCGGGTGGACCTGCTGACAGTCTTCGACAACCCCTGAGAGACTGGC

3121 ACTTTGAGGGATCAGGAGCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTTGA 3180  
TGAAACTCCCTAGTCTCGGGTCCAAATACCTGGGTTACCCCTCGGGGACGTTCAACAAC

3181 CCCTAATAATAGAAGATGAGCATCGGCTACATGAGACCTCAAAGAGCCAGATGTTTCTC 3240  
GGGATTTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGTCTACAAAAGAG

3241 TAGGCTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCCCTGGGGGAAAACCGGGGGCATGGGAC 3300  
ATCCAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCGGACCCGCTTTTGGCCCCGTACCTTG

3' SS (3314)

3301 TGGCAGTTCGCCAAGCTCCTCTGATCATACTCTGAAAGCAACCTCTACCCCCGTGTCCA 3360  
ACCGTCAGCGGTTCCGAGGAGACTAGTATGSAGACTTTCCTTGGAGATGGGGGCACAGGT

3361 TAAACAATACCCCATGTCACAAGAAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGAC 3420  
ATTTTGTATGGGSPACAGTGTCTTCCGGTCTGACCCCTAGTTCGGGGTGTATGTCTCTG

3421 TGTGGACACAGGGAATACTGGTACCTGCCAGTCCCCCTGGAACAGCCCTGCTACCCG 3480  
ACAACCTGGTCCCTTATGACCATGGGACGGTCCAGGGGACCTTGTGGGGGACGATGGCC

3481 TTAAGAAACCAGGGACTAATGATTATAGGCCTGTCCAGGATCTGAGAGAAGTCAACAAGC 3540  
AATTCCTTGGTCCCTGATTACTAATAATCCGGACAGGTCCTAGACTCTCTTCAGTTGTTCC

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

3541 GGGTGAAGACATCCACCCACCGTGCCCAACCCTTACACCTCTTGAGGGGGCTCCCAC 3600  
 CCCACCTTCTGTAGGTGGGGTGGCACGGGTTGGGAATGTTGGAGAACTCGCCCGAGGGTG

3601 CGTCCCACCAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCTTTTTCTGCCTGAGACTCC 3660  
 GCAGGGTGGTCACCATGTGACACCAACTAAATTTCCCTACGGAAAAAGACGGACTCTGAGG

PfeI  
 |  
 TfiI  
 |

3661 ACCCCACCAGTCAGCCTCTCTTCGCCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAG 3720  
 TGGGGTGGTCAGTCGGAGAGAAGCGGAAACTCACCTCTCTAGGTCTCTACCCCTTAGAGTC

MfeI  
 |  
 MunI  
 |

3721 GACAATFGACCTGGACCAGACTCCCACAGGGTTTCAAAAACAGTCCCACCCTGTTTGATG 3780  
 CTGTTAACTGGACCTGGTCTGAGGGGTGTCCCAAAGTTTTTGTGACGGGTGGGACAAACTAC

MroI  
 |  
 BseAI  
 |  
 Bsp13I  
 |  
 BspEI  
 |  
 Kpn2I  
 |  
 AccIII  
 |

3781 AGGCACFGCACAGAGACCTAGCAGACTTCGCGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTAC 3840  
 TCCGTGACGTGTCTCTGGATCGTCTGAAGGCCTAGGTGCTGGGTCTGAAC TAGGACGATG

3841 AGTACGFGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTC 3900  
 TCATGCACCTACTGAAFGACGACCGGGGGTGAAGACTCGATCTGACGGTTGTTCATGAG

3121 ACTTTGAGGGATCAGGAGCCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGTA 3180  
 TGAACCTCCCTAGTCTCTGGGTCCAAATACCCTGGTTACCCCGTGGGGACGTTCCAACT

3181 CCCTAAATATAGAAGATGAGCATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTTCTC 3240  
 GGGATTTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGTCTACAAGAG

3241 TAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTTCTCAGGCCTGGGCGGAAACCGGGGGCATGGGAC 3300  
 ATCCCAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCGGACCCGCCTTTGGCCCCCGFACCCTG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

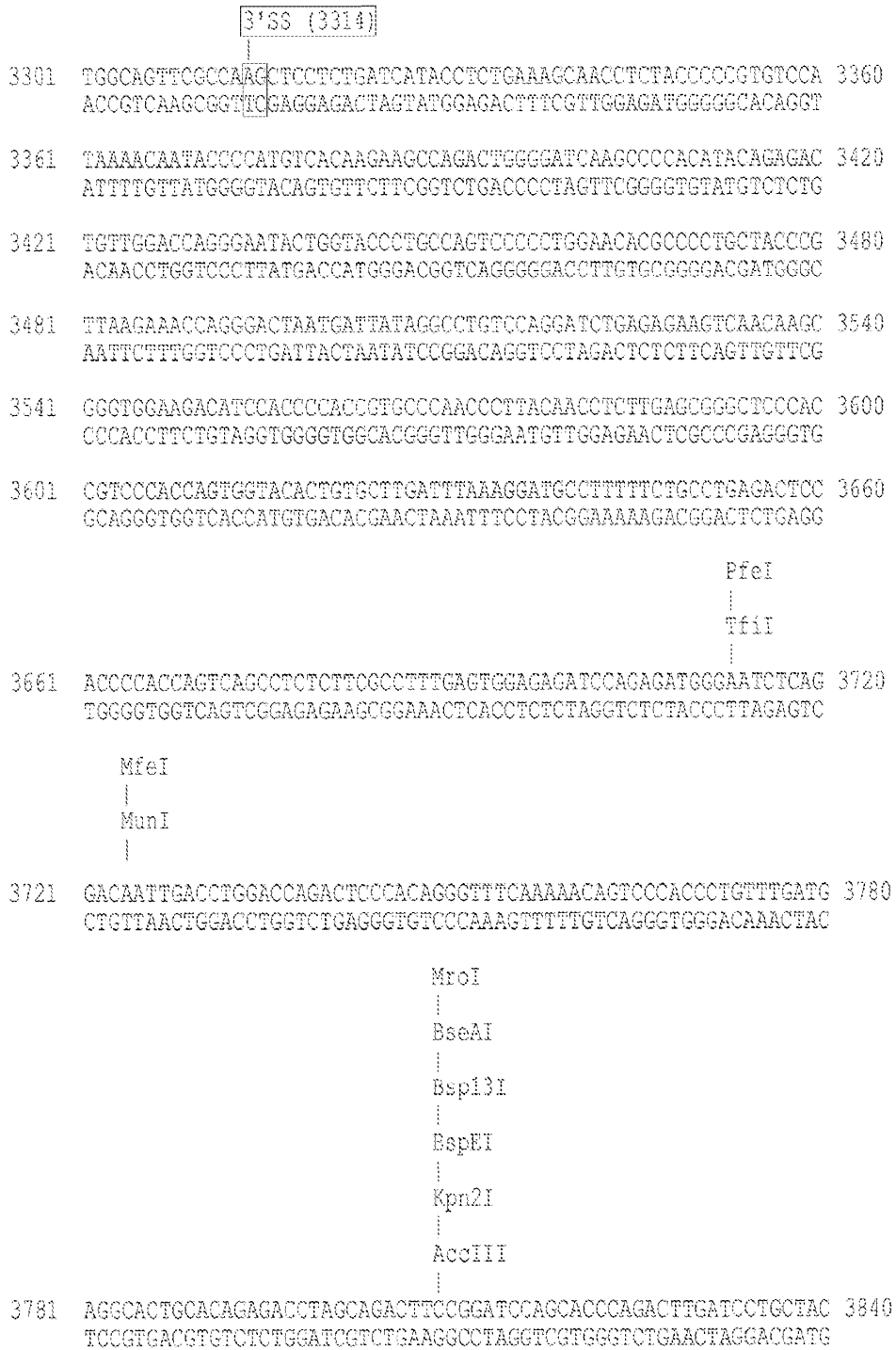


FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

3841 AGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTC 3900  
 TCATGCACCTACTGAATGACGACCGCGGTGAAGACTCGATCTGACGGTTGTTC CRTGAG

3901 GGGCCCTGTTACAAACCCCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCCCTCGGCCAAGAAAGCCCAA 3960  
 CCGGGACAAATGTTTGGGATCCCTTGGAGCCATAGCCCGAGCCGGTTCTTTCCGGTTTT

3961 TTTGCCAGAAACAGGTC AAGTATCTGGGSTATCTTCTAAAAAGAGGTCAGAGATGGCTGA 4020  
 AAACGGTCTTTGTCCAGTTCATAGACCCCATAGAAGATTTTCTCCAGTCTCTACCGACT

4021 CTGAGGDCAGAAAAGAGACTGTGATGGGSCAGCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACATA 4080  
 GACTCCGGTCTTTTCTCTGACACTACCCCGTCGGATGAGGCTTCTGGGGAGCTGTTGATT

4081 GGGAGTTCCCTAGGGACCGGAGGCTTCTGTGCGCTCTGGATCCCTGGGTTTGACAGAAATGG 4140  
 CCTCAAGGATCCCTGCCGTCCGAAGACAGCGGAGACCTAGGGACCCAAACGCTCTTTACC

4141 CAGCCCCCTTGTACCCCTCTCACCAAAAACGGGACTCTGTGTTTAAATGGGGCCAGACCAAAC 4200  
 GTCCGGGGAACATGGGAGACTGGTTTTGCCCTGAGACAAATTAACCCCGGCTCTGGTTG

4201 AAAAGGCCTATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGTTGGCCAG 4260  
 TTTTCCGGATAGTCTTTTACTTCTGTTGAGAAAGATTGACGGGGTCCGGACCCCAACGGTC

S<sub>al</sub>I  
 |

4261 ATTTGACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTGCGACGAGAGCAGGGCTACGCCAAAGGTGTCC 4320  
 TAAACTGATTCGGGAAACTTGAGAAACASCTGCTCTTCGTCCCGATGCGGTTTCCACAGG

4321 TAAGCAAAAAAGCTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTACCTGTCCAAAAAGCTAGACC 4380  
 ATFGCGTTTTTTGACCCCTGGAACCCGACCCGGCCACCGGATGGACAGGTTTTTCGATCTGG

4381 CAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACCGATGCTAGCAGCCATTGCCGTACTGACAA 4440  
 GTCATCGTCGACCCACCGGGGAACGGATGCTTACCATCGTCGGTACCGGCATGACTGTT

4441 AGGATGCAAGCAAGCTAACCATGGGACAGCCACTAGTCAATTCCTGGCCCCCATGCAGTAG 4500  
 TCCTACGTCCGTTGATTTGGTACCCCTGTGCTGATCAGTAAGACCGGGGGGTACGTCATC

4501 AGGCACTAGTCAAACAACCCCGACCGCTGGCTTTCCAAACGCCCGGATGACTCACTATC 4560  
 TCCGTGATCAGTTTTGTTGGGGGGCTGGCGACCGAAAGGTTGCGGGCCTACTGAGTGATAG

4561 AGGCCTTGCTTTTGGACACGGACCGGGTCCAGTTCCGGACCGGTGGTAGCCCTGAACCCGG 4620  
 TCCGGAACGAAAACCTGTGCTTGGCCAGGTC AAGCCTGGCCACCATCGGGACTTGGGCC

4621 CTACGCTGCTCCCACTGCTGAGGAAGGGCTGCAACACAACCTGCTTGATATCCTGGCCG 4680  
 GATGCGACGAGGTTGACGGACTCTTCCCGAOGTTGTGTTGACGGAACATAAGGACCGGC

4681 AAGCCACCGAACCAGCCGACCTAACGGACCGCGCTCCAGACCGCCAGCCACACCT 4740  
 TTCGGGTGCTTGGGCTGGGCTGGATTGCTGCTCGCGGAGGCTCTGCGGCTGTTGTTGA

4741 GGTACACGGATGGAAGCAGTCTCTTACAAGAGGGACAGCGTAAGGGGGGAGCTGCGSTGA 4800  
 CCATGTGCTACCTTCGTCAGAGAATGTTCTCCCTGTCGCATTCGGCCCTCGACCGCACT

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

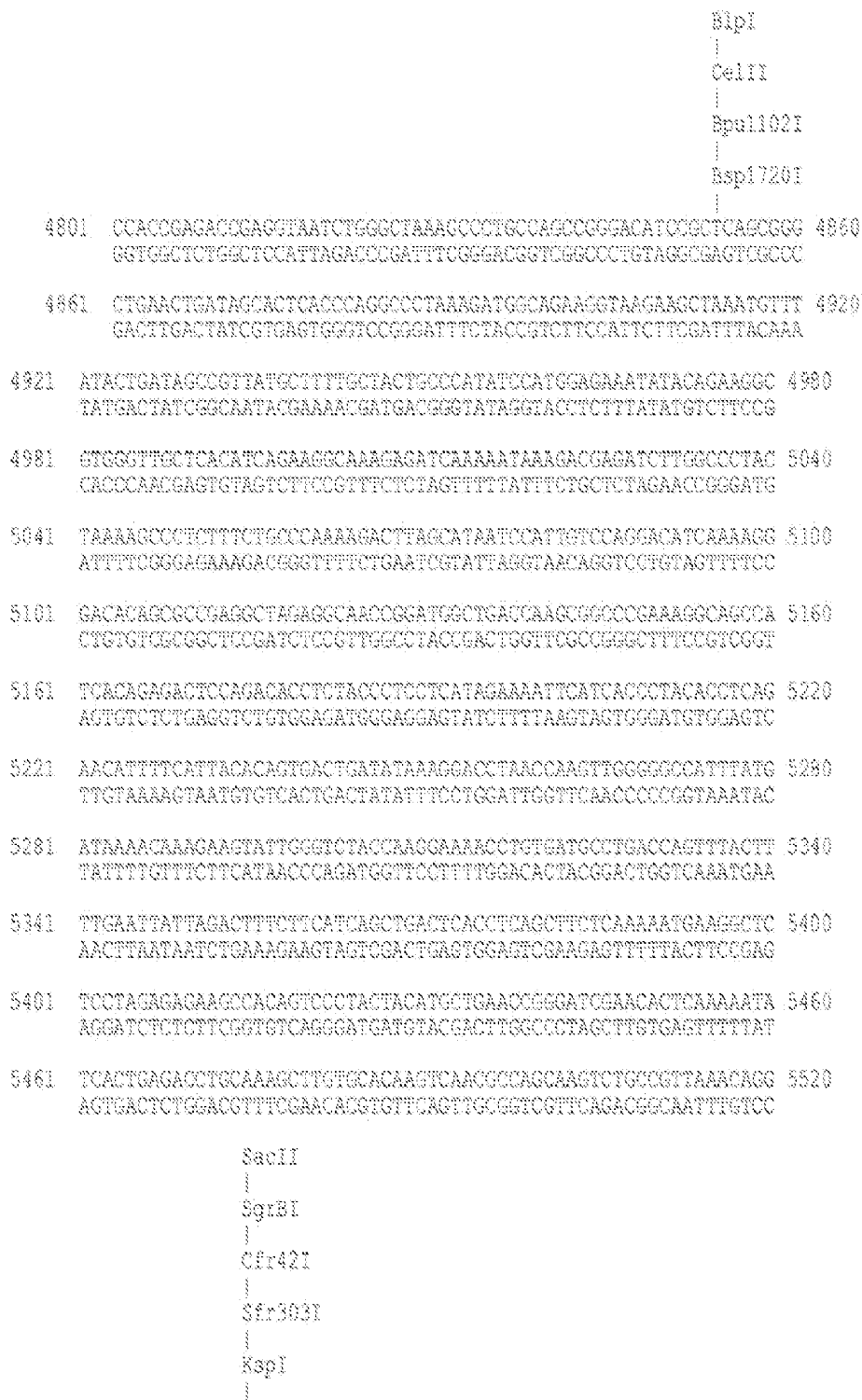


FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

5521 GAACTAGGGTCCGCGGGCATCGGGCCCGGCACTCATTGGGAGATCGATTTCAACCGAGATAA 5580  
 CTTGATCCCAGGCGCCCGTAGCCGGGCCGTGAGTAACCCCTCTAGCTAAAGTGGCTCTATT

5581 AGCCCCGATTGTATGGCTATAAAATATCTTCTAGTTTTTATAGATAACCTTTTCTGGCTGGA 5640  
 TCGGGCCTAACATACCGATATTTATAGAACATCAAAAATATCTATGGAAAAGACCGACCT

5641 TAGAAGCCTTCCCNACCAAGAAAGAAACCGCCAAAGGTCGTAAACCAAGAGCTACTAGAGG 5700  
 ATCTTCGGAAGGGTTGGTTCTTTCTTTGGCGGTTCCAGCATTGGTTCTTCGATGATCTCC

PaeI  
 ↓  
 BbuI  
 ↓  
 SpaHI  
 ↓  
 SphI  
 ↓

5701 AGATCTTCCCAGGTTCCGCATGCCTCAGGTATTGGGAACGACAAATGGGCTGCCTTTCG 5760  
 TCTAGAAAGGGTCCAAGCCGTACGGAGTCCATAACCCCTGACTGTTACCCGGACGGGAAGC

6901 CTTCCAAGGGGCTACTCGAGGGGGCAGATGCAACCCCTCTAGTCCCTAGAAATCACTGATGC 6960  
 GAAGGTTCUCCCGATGAGCTCCCCCGTCTACGTTGGGAGATCAGGATCTTAAGTACTACG

6961 AGGAAAAAAGGCTAACTGGGACGGGCCAAATCGTGGGGACTGAGACTGTACCCGGACAGG 7020  
 TCCFTTTTTCCGATTGACCCCTGCCCGGGTTTAGCACCCCTGACTCTGACATGGCCTGTCC

7021 AACAGATCCCTAFTACCATGTTCTCCCTGACCCGGCAGGTCCTTAATGTGGGACCCCGAGT 7080  
 TTGTCTAGGATAATGGTACAAGAGGGACTGGCCGTCAGGAATTACACCCCTGGGGCTCA

7081 CCCCATAGGGCCCCAACCCAGTATTACCCGACCAAAGACTCCCTTCCCTCACCAATAGAGAT 7140  
 GGGGTATCCCAGGTTGGGTCAFAATGGGCTGGTTTCTGAGGGAAGGAGTGGTTATCTCTA

7141 TGTACCGGCTCCACAGCCACCTAGCCCCCTCAATACCAGTTACCCCTTCCACTACCAG 7200  
 ACATGGCCGAGGTGTCCGTGGATCGGGGAGTTATGGTCAATGGGGGAAGGTGATGGTC

7201 TACACCCCTCAACCTCCCTACAAGTCCAAGTGTCCCACAGCCACCCCTAGGAACCTGGAGA 7260  
 ATGTGGGAGTTGGAGGGGATGTTCCAGGTTCCACAGGTTGTCCGTGGGGTCCCTTGACCTCT

7261 TAGACTACTAGCTCTAGTCAAAGGAGCCTATCAGGCGCTTAACCTCACCAATCCCGACAA 7320  
 ATCTGATGATCGAGATCAGTTTCCCTCGGATAGTCCGCGAATGGAGTGGTTAGGCCTGTT

7321 GACCCCAAGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTCCGGACCTCCTTAFTAAGGAAGGAGTAGCGGT 7380  
 CTGGGTTCTTACAACCGACACGAATCACAGCCCTGGAGGAATAATGCTTCCCTCATCGCCA

7381 CGTGGGCACTTATACCAATCAATCCACCGCTCCGGCCAACTGTACGGCCACTTCCCAACA 7440  
 GCACCCGTGAATATGGTTAGTAAGGTGGCGAGGCCGTTGACATGCCGCTGAAGGCTTGT

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3



FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

7081 CCCCATAGGGCCCAACCCAGTATTACCCGACCAAAGACTCCCTTCCTCACCAATAGAGAT 7140  
 GGGGTATCCCGGGTTGGGTCATAATGGGCTGGTTCCTGAGGGAAGGAGTGGTTATCTCTA

7141 TGTACCGGGCTCCACAGCCACCTAGCCCCCTUAATACCAGTTACCCCCCTCCACTACCAG 7200  
 ACATGGCCGAGGTGTCGGTGGATCGGGGAGTTATGGTCAATGGGGGGAAGGTGATGGTC

7201 TACACCCTCAACCTCCCCFACAAGTCCAAGTGTCCCACAGCCACCCCCAGGAAC TGGAGA 7260  
 ATGTGGGAGTTGGAGGGGATGTTCAAGTTTACAGGGTCTCGGTGGGGGTCCTTGACCTCT

7261 TAGACTACTAGCTTATAGTCAAAGGAGCCTATCAGGGCGCTTAACCTCACC AATCCCGACAA 7320  
 ATCTGATGATCGAGATCAGTTTCCTCGGATAGTCCGCGAAT TGGAGTGGTTAGGGCTGTT

7321 GACCCAGAAGTGTGGCTGTGCTTAGTGTGGGACCTCCTTATTACG AAGGAGTAGCGGT 7380  
 CTGGGTCTTACAACCGACACGAATCACAGCCCTGGAGGAATAATGCTTCCTCATCGCCA

7381 CGTGGGCACTTATACCAATCATTCCACCGTTCGGGCCAACTGTACGGCCACTTCCCAACA 7440  
 GCACCCGTTGAATATGGTTACTAAGCTGGCGAGGCCGGTTGACATGCCGGTGAAGGGTTF

EcoT22I  
 |  
 NsiI  
 |  
 Mph1103I  
 |  
 Zsp2I  
 |  
 BfrBI  
 | |

7441 TAAGCTTACCCCTATCTGAAGTGCACAGGACAGGGCCATATGCATGGGGGCAGTACCTAAAAC 7500  
 APTCGAATGGGATAGACTTCACCTGTCCTGTCCCGGATACGTACCCCGTCATGGATTTG

NaeI  
 |  
 PdiI  
 |  
 MroNI  
 | |  
 NgoMIV  
 | |

7501 TCACCAGGCCTTATGTAACACCACCCAAAGCGCCGCTCAGGATCCTACTACCTTSCAGC 7560  
 AGTGGTCCGGAAATACATTCGTGGTGGGTTTCGCGCCGAGTCTTAGGATGATGGAACGTCG

FIGURA 3E (Cont.)





ES 2 718 546 T3

```

8161 CACCATCATGGGACCTCTAATAGTACTCTTACTGATCTTACTCTTTGGACCTTGCATTCT 8220
      GTGGTACTACCCTGGAGATTATCATGAGAAATGACTAGAANTGAGAAACCTGGAAACGTAAGA

8221 CAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTPTTGGAC 8280
      GTTAGCTAACCAGGTTAAACAATTTCTGTCTTAGAGTCCACCAGGTCGGAGACCAAAAACCTG

                                     IRES reg(8327,8876)>>>
                                     |
                                     MluI (8325)
                                     ||
8281 TCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTACGAGCCATGAACGGTACTGSCCGAA 8340
      AGTCGTTATAGTGGTCGATTTTGGGTATCTCATGCTCGGTACTTGGCGCAATGACCGGCTT

                                     ires_emcv reg(8378,8876)>>>
                                     |
8341 GCGCCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCCSTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGT 8400
      CGGCCAACCCTTATTCCGGCCACACGCCAARACAGATATACAATAAAAGGTGGTATAACGGCA

8401 CTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGG 8460
      GAAAACCGTTTACTCTCCCGGCCCTTTGGACCGGGACAGAAGAACTGCTCGTAAGGATCCC

8461 GTCTTTCCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTGAATGTGCTGAAGGAAGCAGTTC 8520
      CAGAAAGGGGAGAGCGGTTTTCTTACGTTCCAGACAACCTTACAGCACTTCTCTCGTCAAG

8521 CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCCACCCCTTGCAGGCAGCGGAACC 8580
      GACACCTTCGAAGAACCTCTGTTTGTGTCAGACATCGCTGGGAAACGTCCTGCGCCTTGG

8581 CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAACCTGCAA 8640
      GGGTGGACCGCTGTCCACGGGAGACGCGGTTTTTCGGTGCACATATCTATGTGGACGTT

8641 AGGCGGCACAAACCCAGTCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGC 8700
      TCCGCGGTGTTGGGGTCAAGGTGCAACACTCAACCTTATCAACACCTTTCTCAGTTTACCG

8701 TCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAAGSTACCCATTGTATGG 8760
      AGAGGAGTTGTCATAAGTGTGTTCCCGACTTCTTACGGGTCTTCCATGGGGTAACATACC

8761 GATCTGATCTGGGGCCCTGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTGTAGTCEAGGTTAAAAAAC 8820
      CTAGACTAGACCCCGGAGCCACGTGTACGAAATGTACACAAATCAGCTCCAATTTTTTTG

```

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3



FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

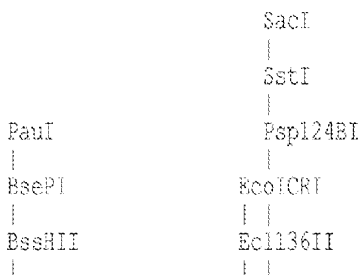
9481 CTGAGAAATAGAGAAGTTTCAGATCAGGTCAGGAACAGATGGAAACAGCTGAATATGGGCCA 9540  
 GACTCTTACCTCTTCAAGTCTAGTTCAGTCCCTTGTCTACCTTGTGGACTTATACCCGGT

9541 AACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGAACA 9600  
 TTCTCCTATAGACACCATTGCTCAGGACGGGGCCGAGTCCCGGTTCTTGTCTACCTTGT

9601 GCTGAATATGGGCCAAGCAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCA 9660  
 CACTTTATACCCGGTTTGTCTATAGACACCATTGCTCAGGACGGGGCCGAGTCCCGGTT

9661 AGAACAGATGGTCCCGCAGATGGGTCCAGCCCTCAGCAGTTCCTAGAGAACCATCAGATG 9720  
 TCTTGTCTACCAGGGGTCTACGCCAGGTGGGAGTCTGCAAGATCTCTTGGTAGTCTAC

9721 TTTCCAGGGTGGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAG 9780  
 AAAGGTCCACGGGGTTCCTGGACTTACTGGACACGGGAATAAAGTCTGATTGGTTAGTC



9781 TTCGCTTCTGGCTTCTGTTCCGGCGCTTCTGCTCCCGAGCTCAATAAAAAGAGCCACAA 9840  
 AAGCGAAGAGCGAAGACAAGCGCCGGAAGACGAGGGCTCGAGTTATTTCTCGGGTGT

R Region(9855, 9921)>>>>

9841 CCCCTCACTGGGGCCGACCTCTCCGATTTGACTGACTCGCCCGGTACCCGTGATCCA 9900  
 GGGGAGTGAGCCCCCGCTCAGGAGGCTAACTGACTCAGCGGGCCATGGCCACATAGGT

U5 Region(9922, 9998)>>>>

9901 ATAAACCCCTTGGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTTTCCTTGGGAGGGTCTCCT 9960  
 TATTTGGGAGAACGTCACCTAGGCTCAACACCAGAGCGACAAGGAACCTCCAGAGGA

9961 CTGAGTGAATTGACTACCCGTCAGCGGGGTCTTTCATTACATGTTGAGCAAAAAGCCAGCA 10020  
 GACTCACTAAGTATGGCCAGTCCCGCCAGAAAGTAATGTACACTCGTTTTCGGTCTGT

pBR322 origin(10045, 10664)<<<

10021 AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC 10080  
 TTTCCGGTCTCTGGCATTTTTCCGGCCACGACCGCAAAAAGGTATCCGAGGGGGGG

10091 TGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAAGAGGTGCCGAACCCGACAGGACTATA 10140  
 ACTGCTCGTAGTGTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCCGCTTTGGGCTGTCTCATAT

10141 AAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTTCTGTTCCGACCTGCC 10200  
 TTCTATGGTCCGCAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGGAGAGGACAAGGCTGGGACGG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

10201 GCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTC 10260  
CGAATGGCCTATGGACAGGGCGGAAGAGSSGAAGCCCTTCGCACCCGCAAGAGTTACGAG

10261 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTSTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA 10320  
TGGGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTCCACCCGACACACGTGCT

10321 ACCCCCCGTTTCAGCCCCACCGCTGGCCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCC 10380  
TGGGGGCAAGTCCGGCTGGCGACCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAACTCAGGTTGGG

10381 GGTAAAGACACCGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAG 10440  
CCATTCGTGTCTGAATAGCGGTGACCGTCTCGTGGTGAACATTTCTCTAATCGTCTCGCTC

10441 GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAG 10500  
CATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTC

10501 GACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG 10560  
CTGTCTATAAACCATAGACCGGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTTCTCAACCATC

10561 CTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC AAGCAGCA 10620  
GAGAACTAGGCCGTTTTGTTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAACAAACGTTCCGTCT

10621 GATTACCGCCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCCTGA 10680  
CTAATGCGCGTCTTTTTTCTTAGAGTTCTTCTAGGAACTAGAAAAGATGCCCCAGACT

10681 CGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGAT 10740  
GCGAGTCACTTTGCTTTTTGAGTGCATTTCCCTAAAACCCAGTACTCTAATAGTTTTTCTTA

10741 CTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA 10800  
GAAGTGGATCTAGGAAAATTTAATTTTTACTTCAAAATTTAGTTAGATTTTCATATATACT

marcador de amp (10819,11679)<<<  
|

10801 GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGAAGGCACCTATCTCAGCGATCTG 10860  
CATTGAAACCAGACTGTCAATGTTACSAATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTCGCTAGAC

10861 TCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAA ACTACGATACGGGA 10920  
AGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGGACFGAGGGGGCAGCACATCTATTTGATGCTATGCCCT

10921 GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCC 10980  
CCCGAATGGTAGACCGGGGTCACGACGTTACTAFGGCGCTCTGGGTGCGAGTGGCCGAGG

10981 AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAAC 11040  
TCTAAATAGTCTGTTATTTGGTCCGGTCCGCCCTTCCCGGCTCGCGTCTTCACCAGGACGTTG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 718 546 T3

11041 TTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC 11100  
 AAATAGGCGGAGGTAGGTACAGATAATTAACAACGGCCCTTCGATCTCATTTCATCAAGCGG

11101 AGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGGCTCGTC 11160  
 TCAATTATCAAACGGCTTGCACAACGGTAACGACGTCGGTAGCACAC&GTGCGAGCAG

11161 GTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGGCAGTTACATGATCCCC 11220  
 CAAACCATACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCCGGCTCAATGTACTAGGGG

11221 CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTT 11280  
 GTACAACACGTTTTTTTCGCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAGTCTTCATTCAA

11281 GCGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCCTTACTGTCAATGCC 11340  
 CCGCGCTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTGTGACGTATTAAGAGAATGACAGTACGG

11341 ATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAATAGTG 11400  
 TAGGCATTCACGAAAAGACACTGACCACCTCATGAGTTGGTTCAGTAAGACTCTTATCAC

11401 TATGCGGGCAGCCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAAATACCGCGCCACATAG 11460  
 ATACCGCGCTGGCTCAACGAGAACGGCGCCGAGTTGTGCCCTATTATGGCGCGGTGTATC

11461 CAGAACTTTAAAAGTGCTCATCAATGGAAAACGTTCTTGGGGGCGAAAACCTCTCAAGGAT 11520  
 GTCTTGAATTTTACAGAGTAGTAACCTTTTGAAGAAGCCCCGCTTTTGAGAGTTCTTA

11521 CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGC 11580  
 GAATGGCGACAACCTCTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGGGTGACTAGAAGTCC

11581 ATCTTTTACTTTCAACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAA 11640  
 TAGAAAATGAAAGTGGTCGCAAAGACCCACTCGTTTTTGTCTTCCGTTTTTACGGCGPTT

11641 AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTA 11700  
 TTTCCCTTATTCCCCTGTGCCTTACAACTTATGAGTATGAGAAGGAAAAGTTATAAT

prom. de amp (11721,11749)<<<  
 |

11701 TTGAAGCATTATCAGGGTTAATGTCATGACCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA 11760  
 AACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAAACTTACATAAATCTT

11761 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGA 11820  
 TTTATTTGTTTATCCCCAAGGCGCGTGTAAAGGGGCTTTTACGGTGGACTGCAGATTCT

11821 AACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGGGTATCACGAGGCCCTTTCTCT 11880  
 TTGGTAATAATAGTACTGTAATTTGGATATTTTTATCCGCATAGTGTCTCCGGGAAAGCAGA

11881 TCAAGAATTCAT 11892  
 AGTTCTTAAGTA

FIGURA 3E (Cont.)

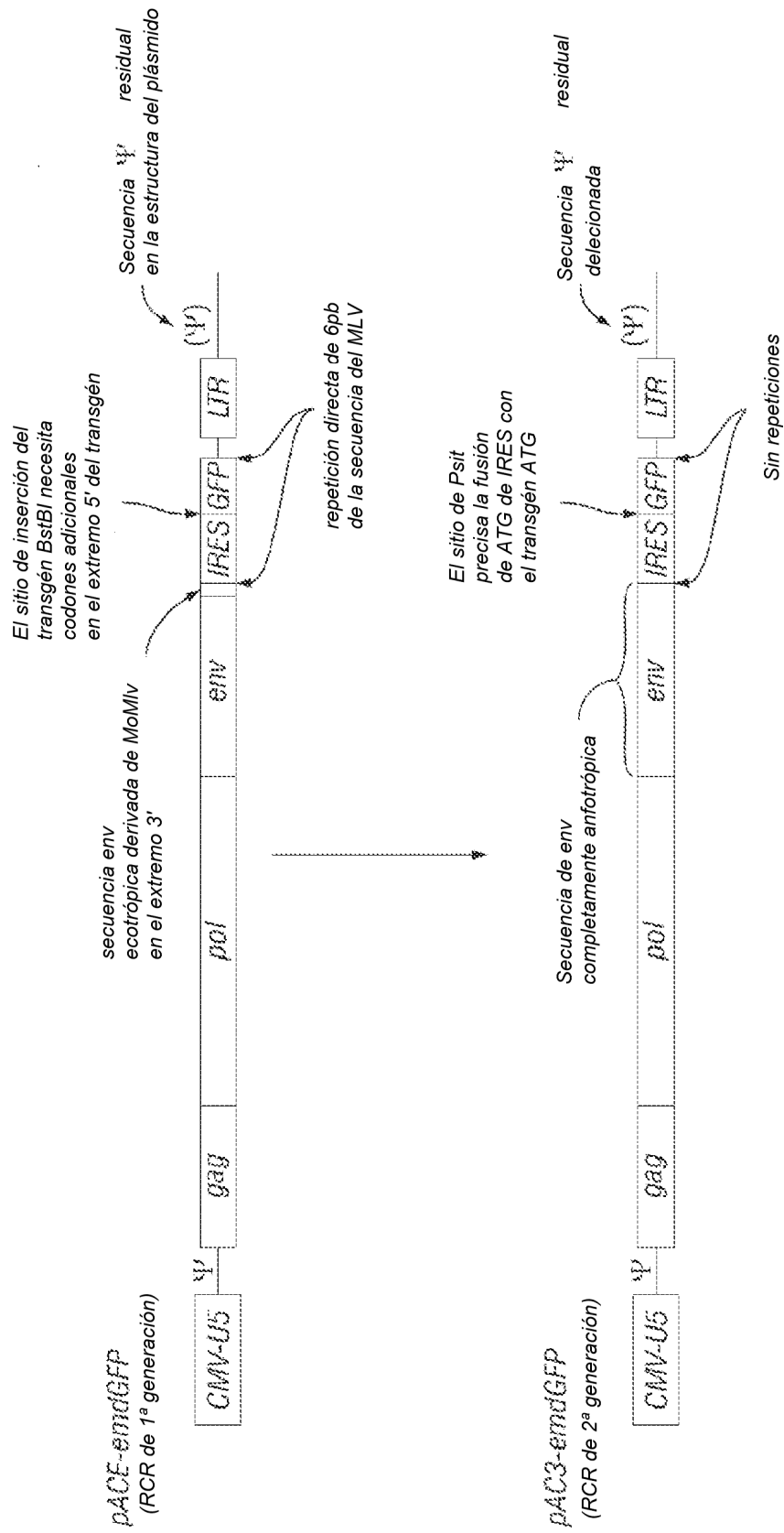
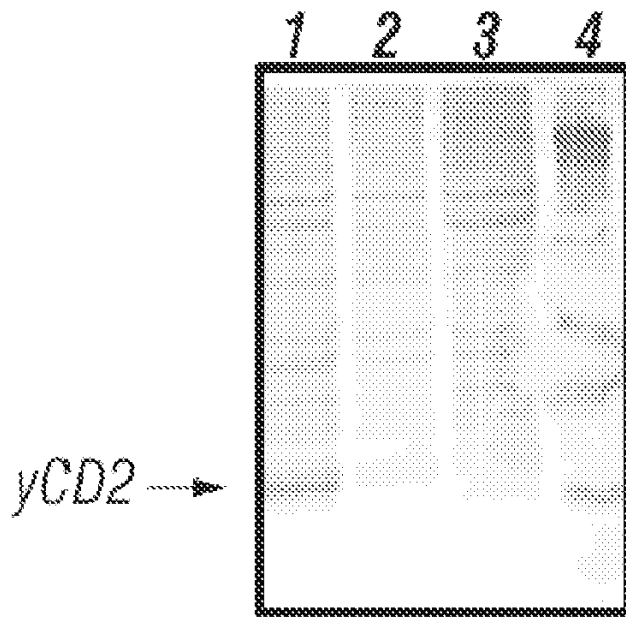


FIGURA 3F



- 1 - U87 + AC3-yCD2 (V)**
- 2 - U87 + ACE-yCD (V)**
- 3 - U87 (no infectada)**
- 4 - Patrones del peso molecular**

FIGURA 4



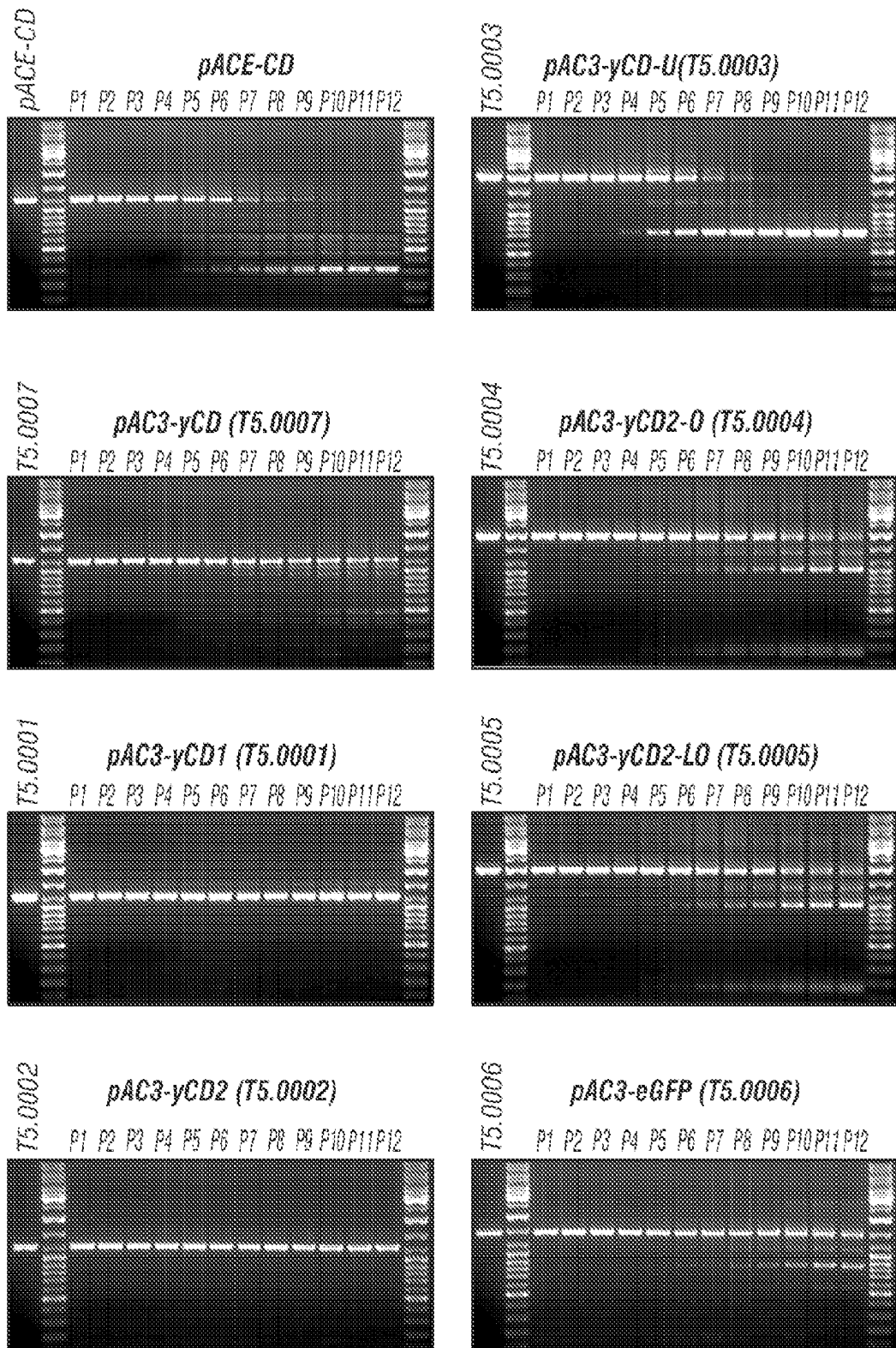


FIGURA 5

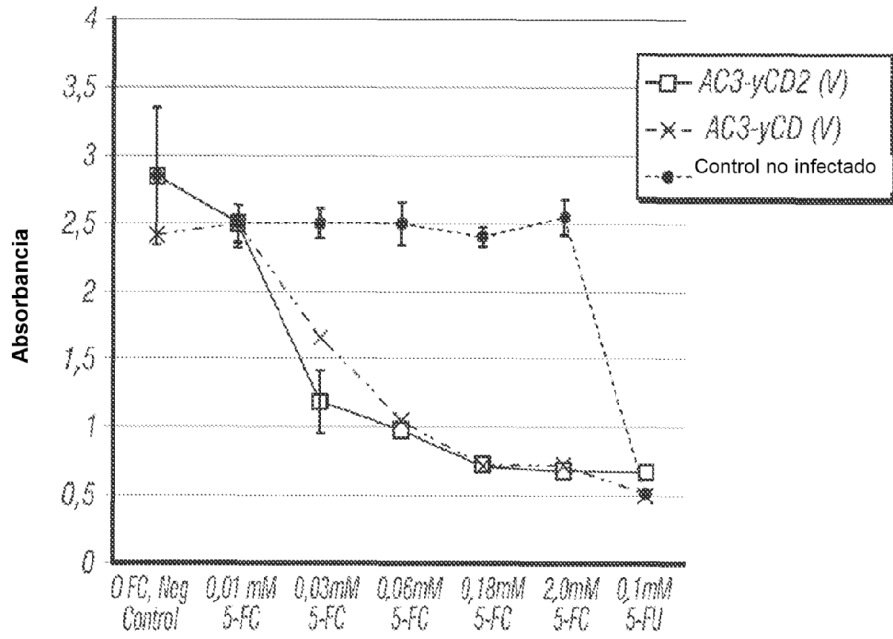


FIGURA 6A

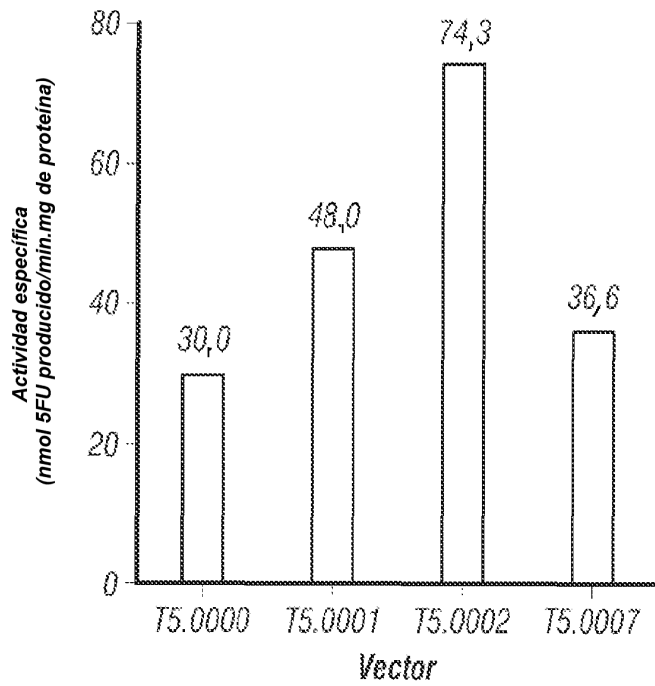


FIGURA 6B

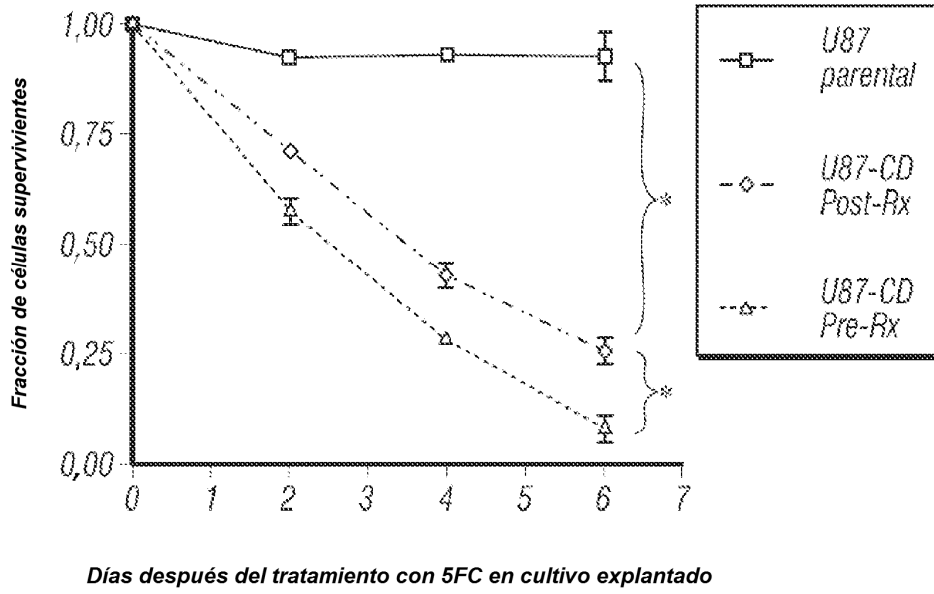


FIGURA 7

Modelo intracraneal de xenoinjerto desnudo U-87-10 animales/grupo

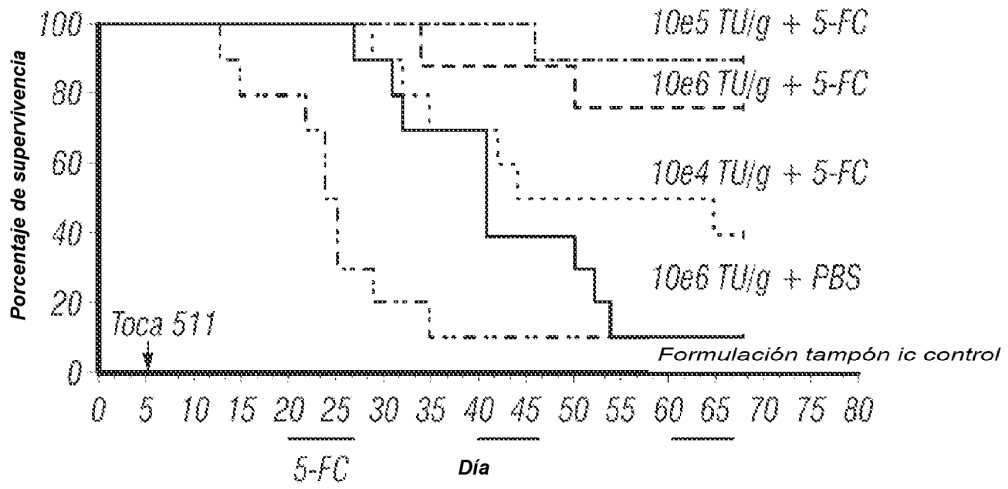
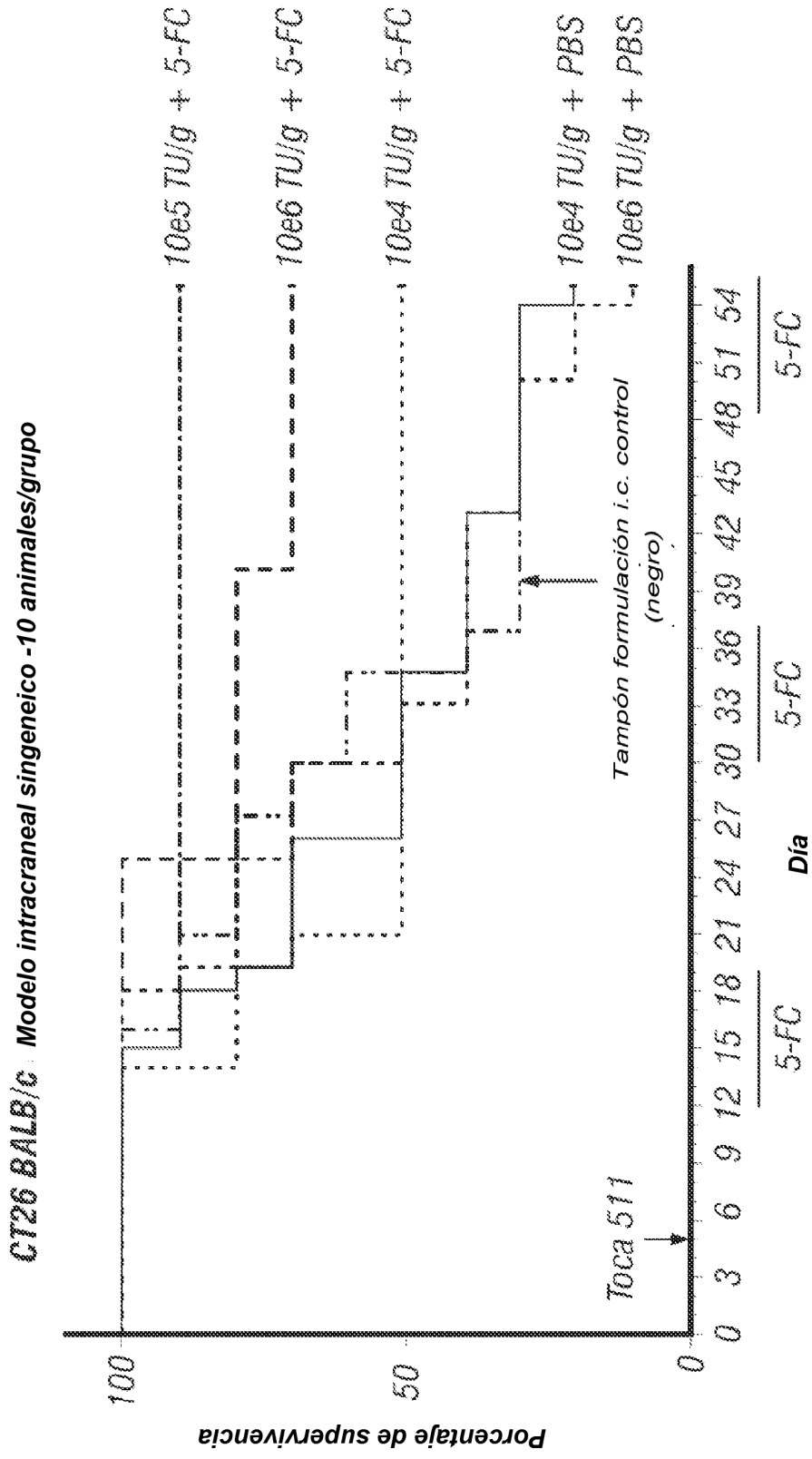


FIGURA 8



**FIGURA 9**

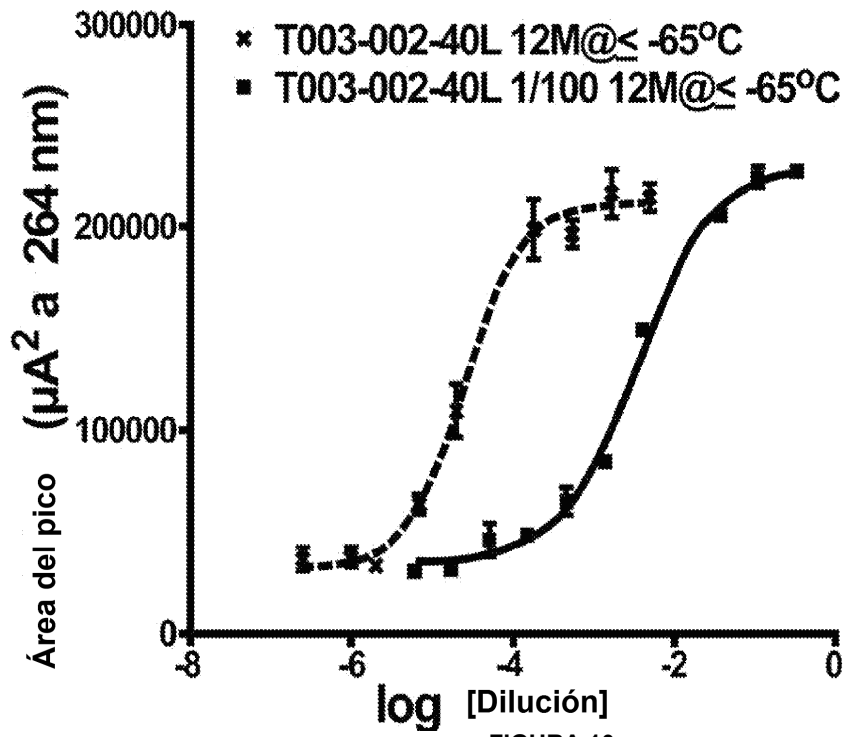


FIGURA 10

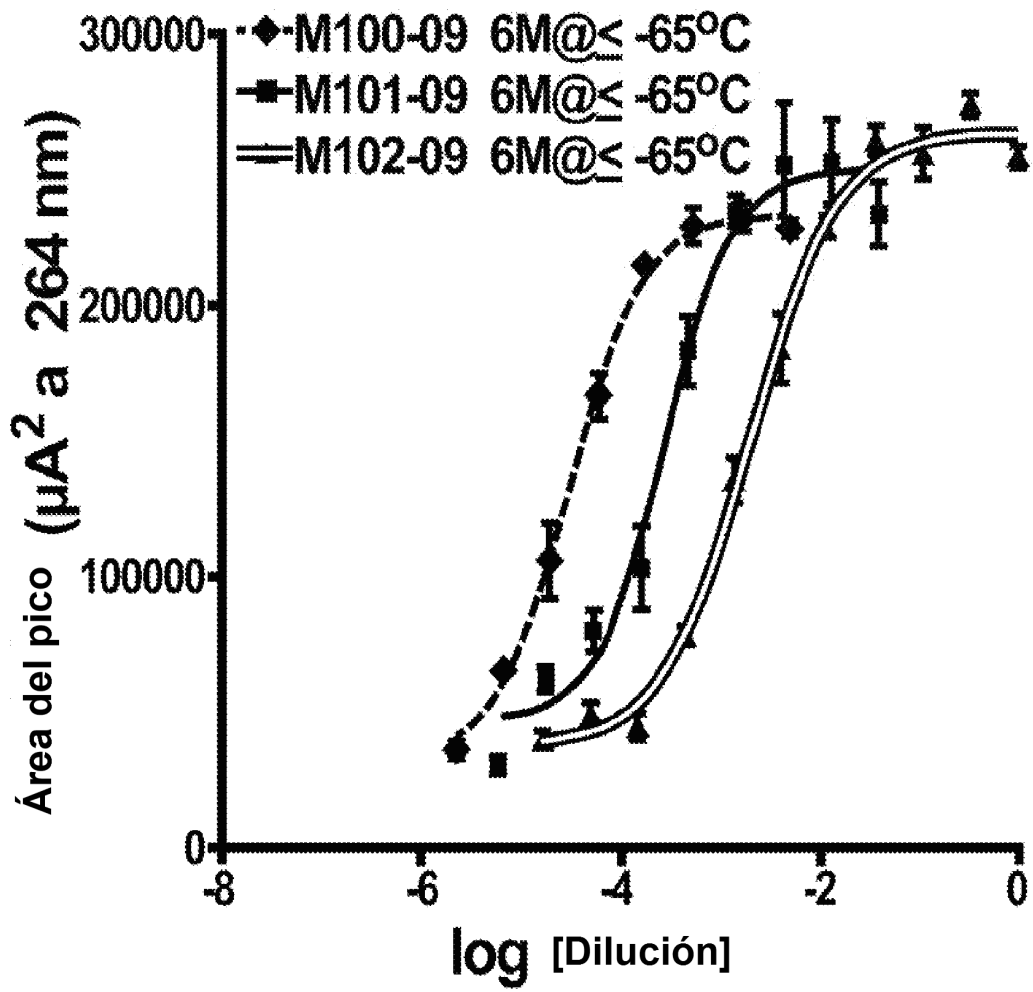
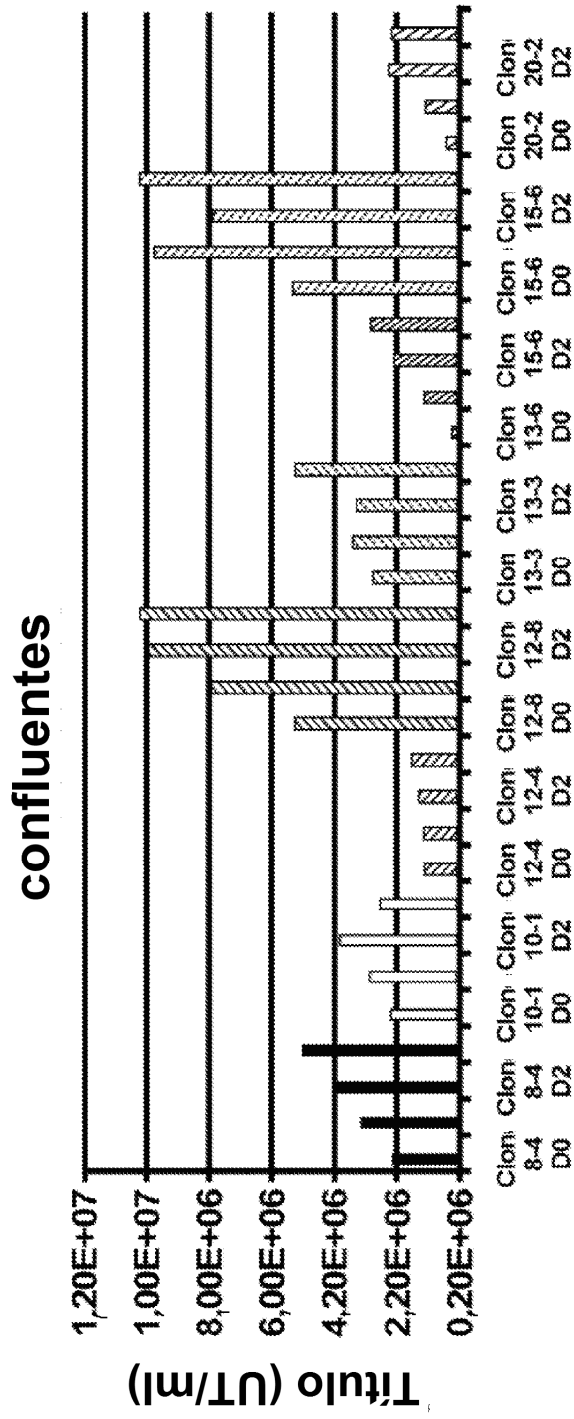


FIGURA 11

**Comparación directa de clones HT1080T5.0002 Adherentes  
para la producción del título de cultivos  
confluentes**



**FIGURA 12**

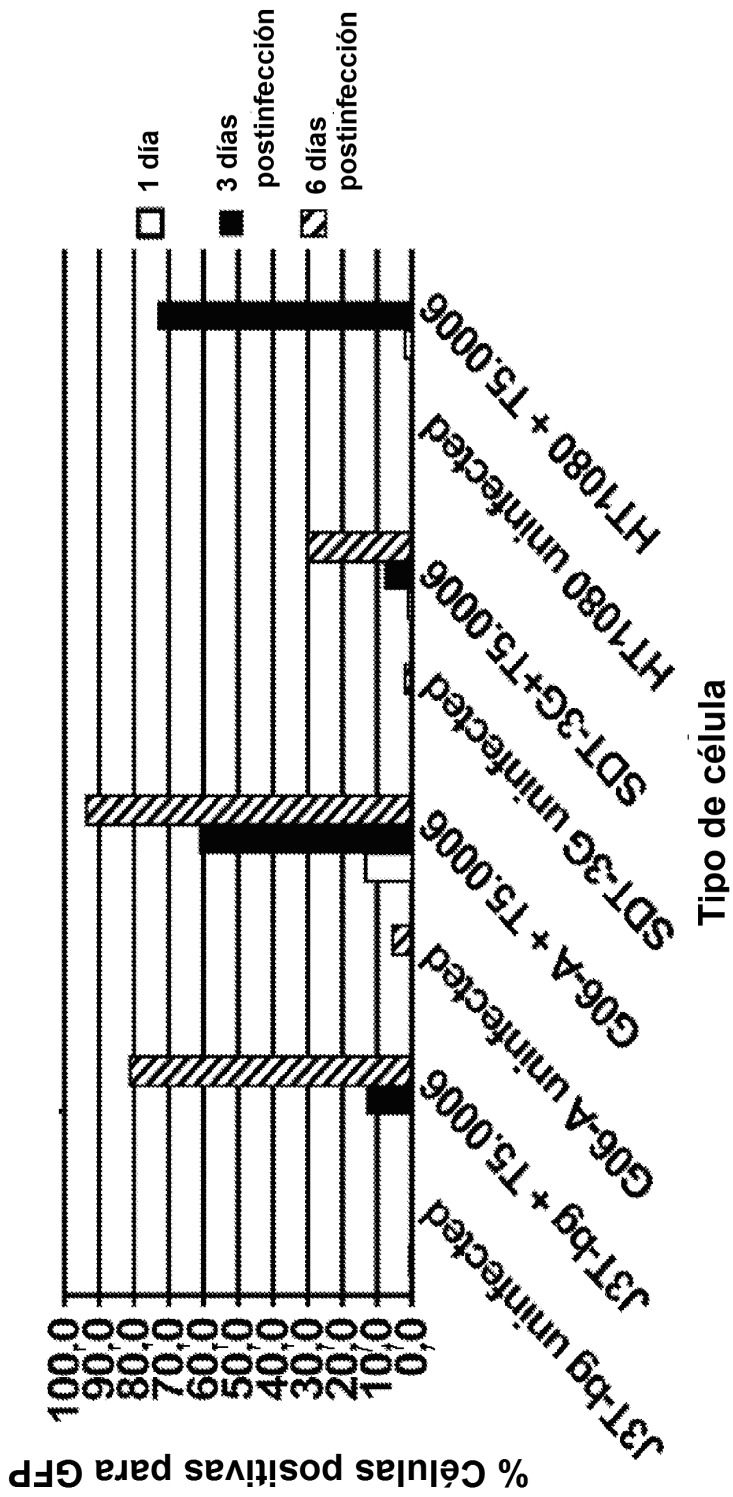


FIGURA 13



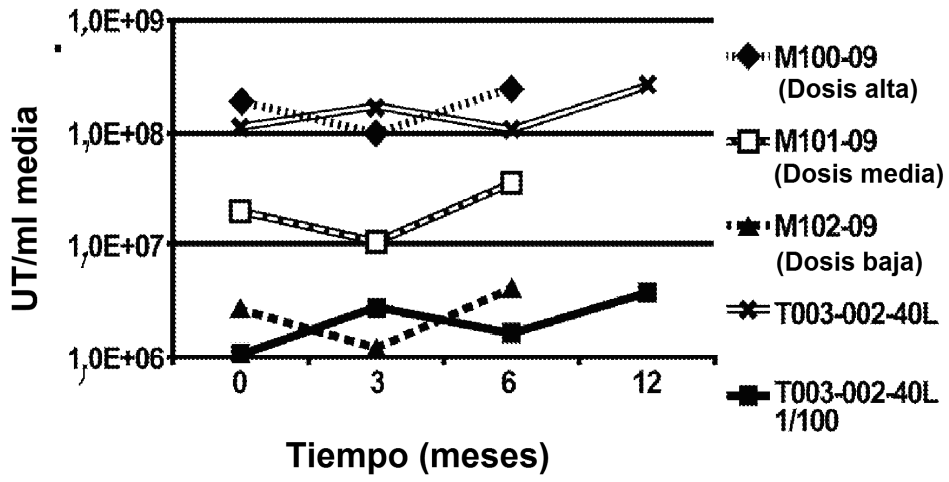


FIGURA 14

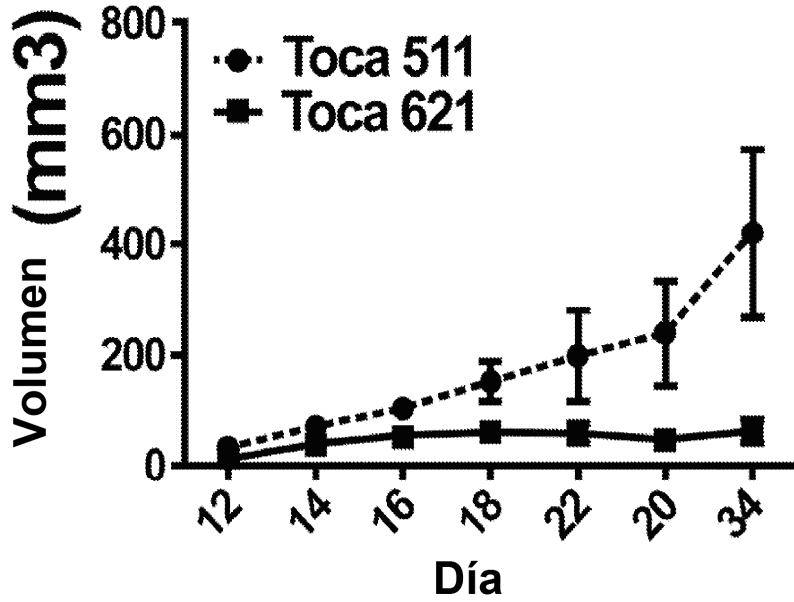


FIGURA 15

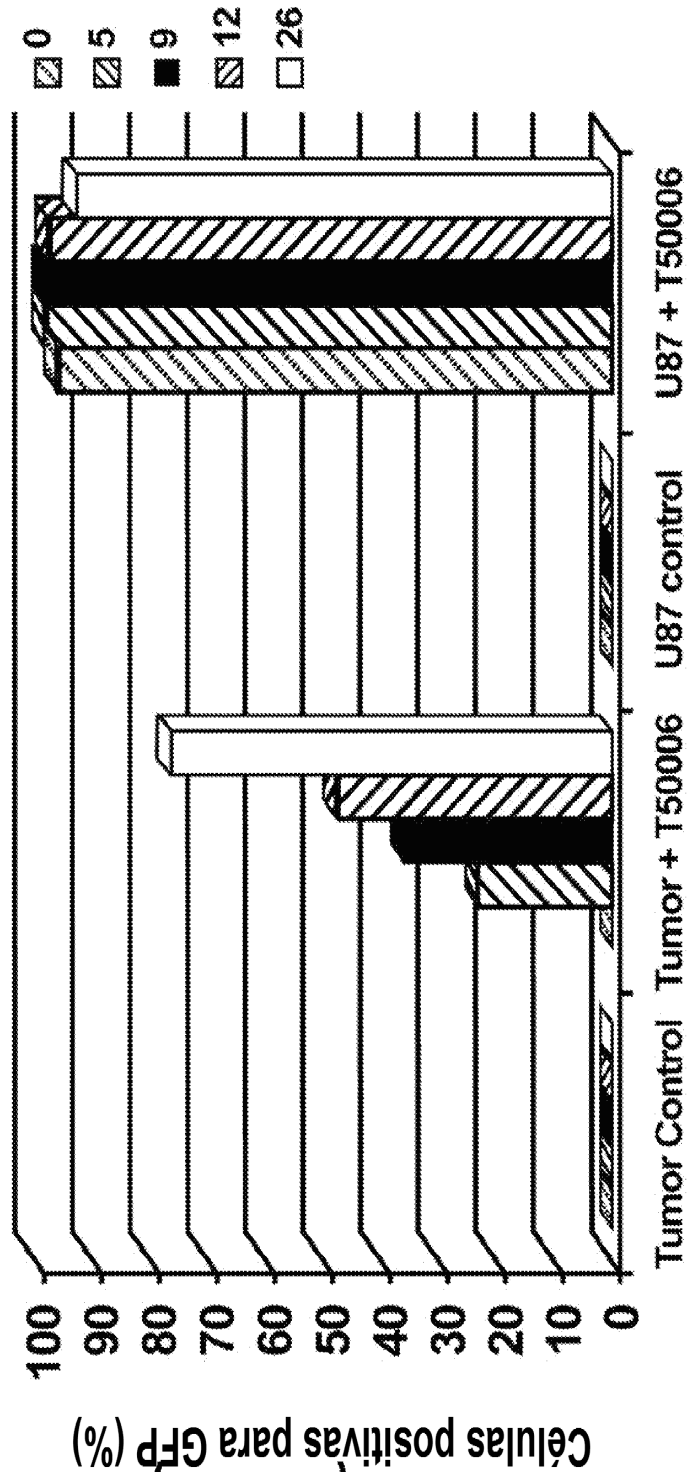


FIGURA 16