

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 176**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/867</b>	(2006.01)	<b>C12N 7/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/76</b>	(2015.01)	<b>A61K 38/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)		
<b>C07K 14/47</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/071</b>	(2010.01)		
<b>C12N 15/86</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006** **E 15190286 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2019** **EP 2993235**

54 Título: **Transferencia génica en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias mediante el uso de vectores lentivíricos de simio pseudotipados con una proteína espina de virus Sendai de ARN**

30 Prioridad:

**28.10.2005 JP 2005313971**

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

**02.10.2019**

73 Titular/es:

**ID PHARMA CO., LTD. (100.0%)**  
**6 Ohkubo, Tsukuba**  
**Ibaraki 300-2611, JP**

72 Inventor/es:

**MITOMO, KATSUYUKI;**  
**INOUE, MAKOTO;**  
**IWASAKI, HITOSHI;**  
**HASEGAWA, MAMORU;**  
**ALTON, ERIC W. y**  
**GRIESENBACH, UTA**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 726 176 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Transferencia génica en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias mediante el uso de vectores lentivíricos de simio pseudotipados con una proteína espina de virus Sendai de ARN

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a vectores de SIV recombinantes pseudotipados con proteínas espina de virus de ARN o ADN para la introducción de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias.

10

Antecedentes en la técnica

La fibrosis quística (FQ) es el trastorno autosómico recesivo letal más habitual en seres humanos de origen caucásico. Está provocado por mutaciones en el gen del regulador de la conductancia transmembranosa de la fibrosis quística (CFTR). Dichas mutaciones impiden la transferencia de genes a través del epitelio de las vías respiratorias, lo que da lugar a un engrosamiento de la mucosa y a la adhesión de bacterias, provocando en última instancia el trastorno. Por tanto, las células epiteliales de las vías respiratorias son dianas importantes para el tratamiento génico.

20 Para la expresión de transgenes a largo plazo, es importante introducir genes en células progenitoras epiteliales de las vías respiratorias, incluidos citoblastos. Las "citoblastos" se refieren a células sin diferenciar que son multipotentes y capaces de auto-renovarse. En el caso de las vías respiratorias, los citoblastos se encuentran presentes cerca del epitelio ductal de las glándulas de la submucosa y de las células basales de la membrana basal, y el epitelio ductal y las células basales están protegidas de toxinas y lesiones externas (véanse Documentos no de  
25 patente 1 y 2). Por otra parte, en la tráquea de ratón, también se ha informado de que se encuentran dispersas en el tejido cartilaginoso (véase Documento no de patente 1). En general, puesto que los citoblastos epiteliales se encuentran en un número muy bajo y existen en localizaciones aisladas en las glándulas de la submucosa, es difícil adoptar una estrategia de transferencia génica o similar. Por otra parte, se sabe que las células epiteliales de las vías respiratorias que incluyen citoblastos son tejidos en los que es muy difícil la transferencia génica debido a la  
30 presencia de la capa de mucina y moco.

Además, las células epiteliales de las vías respiratorias presentan polaridad, y el lado en contacto con el aire del exterior se denomina lado apical, y el lado celómico se conoce como lado basolateral. Puesto que no hay receptores de virus sobre la superficie apical de las células epiteliales de las vías respiratorias, apenas existe algún vector que  
35 se pueda transducir eficazmente en el epitelio intacto de las vías respiratorias. Los receptores para la mayoría de los virus, incluidos adenovirus, están presentes en el lado basolateral; por tanto, es necesario el preacondicionamiento usando EGTA, tensioactivos y similares inmediatamente antes de la transferencia génica. En el caso de vectores lentivíricos pseudotipados con glicoproteínas del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), por ejemplo, la superficie del epitelio se debe pre-acondicionar con un detergente para llevar a cabo una transfección eficiente. No obstante,  
40 clínicamente puede no ser posible usar el tratamiento con estas sustancias químicas.

Los vectores para terapia génica y los métodos para su administración se encuentran en desarrollo para enfermedades genéticas con deterioro del sistema respiratorio, tales como la fibrosis quística. Para la transferencia génica en células epiteliales de las vías respiratorias, es necesario introducir el gen desde el lado apical de las  
45 células epiteliales atravesando la capa de mucina y el moco. La invasión de vectores víricos que infectan desde el lado basolateral está bloqueada por uniones intercelulares herméticas presentes entre las células epiteliales. Por consiguiente, se emplean métodos de administración que interrumpen estas uniones intercelulares herméticas con el uso combinado de un agente quelante de calcio, el EGTA, y diversos tensioactivos. No obstante, dichos tratamientos (preacondicionamiento) no es deseable para su aplicación clínica en seres humanos.

50

Puesto que los receptores de VSV-G, que se usan en general para el pseudotipado, se encuentran presentes en el lado basolateral de las células epiteliales de las vías respiratorias, es necesario el tratamiento con lisofosfatidilcolina (LPC; un tipo de tensioactivo) para la transferencia génica. Cuando la cavidad nasal de un ratón se infectó con un vector del VIH pseudotipado con VSV-G (gen transportado; lacZ) después del tratamiento con LPC, la expresión  
55 transgénica se mantuvo durante al menos 92 días (véase Documento no de patente 3). El resultado sugiere que el gen se ha introducido en los citoblastos debido a que las células epiteliales sobrevivieron tres meses. Como ejemplo de pseudotipado de vector lentivírico sin preacondicionamiento, se ha informado de una proteína de la envoltura de la cepa Zaire del virus del Ébola (véase Documento no de patente 4). Se comprobó que el gen transportado lacZ se mantuvo durante 63 días en los tejidos de las vías respiratorias de ratón. Aunque la duración de este experimento

fue inferior al tiempo de supervivencia de las células epiteliales, se confirmó que el gen se había transfectado en la glándula submucosa en la que se dice que existen citoblastos.

También se conocen los siguientes documentos.

5

[Documento no de patente 1] Borthwick et al., Am J. Respir. Cell Mol. Biol., Vol. 24, pp. 662-670, 2001

[Documento no de patente 2] Engelhardt, Am J. Respir. Cell Mol. Biol., Vol. 24, pp. 649-652, 2001

10 [Documento no de patente 3] Limberis, et al., Human Gene Therapy, Vol. 13, pp. 1961-1970, 2002

[Documento no de patente 4] Kobinger et al., Nature Biotechnology, Vol. 19, pp. 225-230, 2001

15 [Documento no de patente 5] Alberto Auricchio et al., The Journal of Clinical Investigation, Vol. 110, Number 4, pp. 499-504, 2002

[Documento no de patente 6] John F. Engelhardt, The Journal of Clinical Investigation, Vol. 110, Number 4, pp. 429-432, 2002

20 [Documento no de patente 7] Kobayashi M. et al., J. Virol. 77(4): 2607-2614, 2003

[Documento no de patente 8] Mitomo et al., Mol. Therapy 11:139, 2005

[Documento no patente] WO 01/92508A1 y EP1291419

25

#### Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

30 Un objetivo de la presente invención es proporcionar vectores de SIV recombinantes pseudotipados con proteínas espina de virus de ARN o ADN para la introducción de genes en los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias.

Medios para resolver los problemas

35 Los presentes inventores realizaron una investigación dedicada para resolver los problemas anteriormente mencionados. Específicamente, para desarrollar vectores que puedan introducir genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias, se sometieron a pseudotipado vectores de un virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), un tipo de lentivirus, con glicoproteínas de la envoltura F y HN, que son proteínas espina del virus Sendai, un tipo de virus de ARN.

40

El epitelio de las vías respiratorias está cubierto de moco, y ha sido difícil transferir genes en las células epiteliales de las vías respiratorias y similares con técnicas convencionales. Para introducir genes en estas células, se ha intentado un método que extrae físicamente la matriz extracelular tal como moco mediante lavado. No obstante, este método era tedioso y planteaba el riesgo de dañar el tejido.

45

En esta ocasión, los presentes inventores se han centrado en la función del virus Sendai, un virus que infecta el sistema de las vías respiratorias, para su transfección eficaz a partir de las células epiteliales de las vías respiratorias del lado apical que no hayan sido pre-acondicionadas; los vectores desarrollados produjeron un vector del virus de la inmunodeficiencia de simios mediante pseudotipado, con glicoproteínas de la envoltura F y HN del virus Sendai; y por primera vez, se han descubierto métodos de uso de estos vectores para introducir genes en las

50

células epiteliales de las vías respiratorias y citoblastos de las vías respiratorias.

Los vectores lentivíricos tales como los vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios incorporan un gen transportado en un genoma hospedador mediante la acción de una integrasa. Por tanto, si los genes se pueden

55

introducir en citoblastos usando un vector del virus de la inmunodeficiencia de simios pseudotipado con glicoproteínas del virus Sendai, los vectores serán útiles para el tratamiento de enfermedades genéticas del sistema respiratorio, tales como la fibrosis quística.

Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores han desarrollado vectores producidos mediante

pseudotipado de vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios con glicoproteínas F y HN que son proteínas espina del virus Sendai que infecta las vías respiratorias; y han desarrollado métodos de uso de estos vectores para la introducción eficaz de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias sin precondicionar desde el lado apical a través de la capa de moco. Mediante el uso de glicoproteínas de virus que infectan las vías respiratorias tales como proteínas de la envoltura, fue posible introducir genes en las células epiteliales de las vías respiratorias así como citoblastos, incluidas células progenitoras. La técnica para la introducción de genes en citoblastos usando los vectores de la presente invención permite el mantenimiento estable de la expresión génica, mucho más allá del tiempo de supervivencia de las células epiteliales.

10 Específicamente, la presente invención se refiere a vectores de SIV recombinantes pseudotipados con proteínas espina de virus de ARN o ADN para la introducción de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias.

Por consiguiente, tal como se reivindica, la presente invención proporciona un vector del SIV recombinante para su uso en el tratamiento de una enfermedad respiratoria genética mediante la introducción de un gen en un citoblasto epitelial de las vías respiratorias que no haya sido sometido a pretratamiento o tratamiento de precondicionamiento, en el que el vector (i) se somete a pseudotipado con proteínas espina de glicoproteínas de la envoltura F y HN del virus Sendai, y (ii) comprende un gen exógeno en un estado expresable, y en el que además dicho vector permite la integración de dicho gen exógeno en dicho citoblasto para así proporcionar la expresión a largo plazo del gen exógeno durante al menos 160 días, en el que el gen exógeno es: (a) un gen que codifica una proteína disfuncional inherente o adquirida; (b) un gen que complementa un gen deficiente en una enfermedad respiratoria genética; o (c) un gen que codifica una proteína que es necesaria para el tratamiento de una enfermedad respiratoria genética.

La invención además proporciona el uso de un vector del SIV recombinante en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad respiratoria genética, en el que:

25 (a) dicho vector se somete a pseudotipado con proteínas espina de glicoproteínas de la envoltura F y HN del virus Sendai y comprende un gen exógeno en un estado expresable y en el que dicho vector permite la integración de dicho gen exógeno en un citoblasto epitelial de las vías respiratorias para así proporcionar una expresión a largo plazo del gen exógeno durante al menos 160 días; y (b) dicho medicamento es para su administración a citoblastos de las vías respiratorias; en el que el gen exógeno es: (a) un gen que codifica una proteína disfuncional inherente o  
30 adquirida; (b) un gen que complementa un gen deficiente en una enfermedad respiratoria genética; o (c) un gen que codifica una proteína que es necesaria para el tratamiento de una enfermedad respiratoria genética.

El vector del SIV recombinante puede derivar de una cepa agm. El vector del SIV recombinante puede ser un vector auto-inactivante en el que la secuencia promotora para la región U3 LTR 3' se ha eliminado y/o sustituido por otra  
35 secuencia promotora.

En una realización, tal como se reivindica, el gen exógeno es un gen que codifica: (a) un factor causante de la fibrosis quística (FQ) disfuncional inherente o adquirido; (b) una proteína CFTR disfuncional inherente o adquirida; (c) una proteína que tiene un efecto terapéutico sobre la fibrosis quística; (d) una proteína CFTR que es necesaria  
40 para el tratamiento de la fibrosis quística; o (e) una proteína CFTR, en la que la expresión de dicha proteína CFTR complementa un gen de CFTR deficiente.

Otros aspectos descritos son los siguientes:

45 [01] Un vector lentivírico para la introducción de un gen en un citoblasto epitelial de las vías respiratorias, en el que el vector se somete a pseudotipado con una proteína espina de virus de ARN o ADN;

[02] el vector lentivírico de [1], en el que el virus de ARN es un virus de ARN que infecta un tejido de las vías respiratorias;

50

[03] el vector lentivírico de [1], en el que el virus de ARN es un virus de ARN de la hebra no codificante;

[04] el vector lentivírico de [3], en el que el virus de ARN de la hebra no codificante es un paramixovirus;

55 [05] el vector lentivírico de [4], en el que el paramixovirus es el virus Sendai;

[06] el vector lentivírico de [3], en el que el virus de ARN de la hebra no codificante es un ortomixovirus;

[07] el vector lentivírico de [6], en el que el ortomixovirus es un virus de la gripe;

- [08] el vector lentivírico de [3], en el que el virus de ARN de la hebra no codificante es un filovirus;
- 5 [09] el vector vírico de [8], en el que el filovirus es el virus de la fiebre hemorrágica del Ébola;
- [10] el vector lentivírico de [1], en el que el virus de ARN es un virus de ARN de la hebra codificante;
- [11] el vector lentivírico de [10], en el que el virus de ARN de la hebra codificante es un coronavirus;
- 10 [12] el vector lentivírico de [11], en el que el coronavirus es coronavirus del SARS;
- [13] el vector lentivírico de [1], en el que el virus de ADN es un virus de ADN que infecta un tejido de las vías respiratorias;
- 15 [14] el vector lentivírico de [13], en el que el virus de ADN es un baculovirus;
- [15] el vector lentivírico de uno cualquiera de [1] a [14], en el que el vector lentivírico es un vector del virus de la inmunodeficiencia de simios recombinante;
- 20 [16] el vector lentivírico de [15], en el que el vector del virus de la inmunodeficiencia de simios recombinante procede de una cepa agm;
- [17] el vector lentivírico de [15] o [16], en el que el vector del virus de la inmunodeficiencia de simios recombinante es un vector auto-inactivante;
- 25 [18] el vector lentivírico de uno cualquiera de [1] a [14], en el que el vector lentivírico es un vector vírico de la anemia infecciosa equina, un vector del virus de la inmunodeficiencia humana [1], un vector del virus de la inmunodeficiencia humana [2], o un vector del virus de la inmunodeficiencia felina;
- 30 [19] el vector lentivírico de uno cualquiera de [1] a [18], que porta un gen exógeno en un estado expresable;
- [20] el vector lentivírico de [19], en el que el gen exógeno es un gen que codifica una proteína seleccionada entre la proteína verde fluorescente, la betagalactosidasa, y la luciferasa;
- 35 [21] el vector lentivírico de [19], en el que el gen exógeno es un gen que codifica una proteína disfuncional inherente o adquirida;
- [22] el vector lentivírico de [19], en el que el gen exógeno es un gen que codifica un factor causante de la fibrosis quística (FQ) disfuncional inherente o adquirida;
- 40 [23] el vector lentivírico de [19], en el que el gen exógeno es un gen que codifica una proteína CFTR (reguladora de la conductancia transmembranosa de la fibrosis quística) disfuncional inherente o adquirida;
- [24] el vector lentivírico de [19], en el que el gen exógeno es un gen que codifica una proteína que tiene un efecto terapéutico sobre la fibrosis quística;
- 45 [25] el vector lentivírico de [19], en el que el gen exógeno es un gen que codifica una proteína que se ha vuelto disfuncional debido a una enfermedad genética;
- 50 [26] el vector lentivírico de [25], en el que la proteína que se ha vuelto disfuncional debido a una enfermedad genética es un gen que codifica el CFTR;
- [27] un método para la introducción de un gen en un citoblasto epitelial de las vías respiratorias, que comprende la etapa de puesta en contacto de una célula epitelial de las vías respiratorias con el vector lentivírico de uno
- 55 cualquiera de [1] a [26];
- [28] un citoblasto epitelial de las vías respiratorias en el que se ha introducido el vector lentivírico de uno cualquiera de [1] a [26];

[29] un agente para la transferencia de un gen en un citoblasto epitelial de las vías aéreas, que comprende el vector lentivírico de uno cualquiera de [1] a [26] como principio activo;

[30] el agente de [29], en el que se usa el pulmón como tejido de producción para proporcionar una proteína  
5 necesaria para el tratamiento de la enfermedad;

[31] un agente terapéutico para una enfermedad respiratoria genética, que comprende el vector lentivírico de uno cualquiera de [1] a [26] como principio activo; y

10 [32] el agente terapéutico de [31], en el que la enfermedad respiratoria genética es la fibrosis quística.

En el presente documento se describen métodos para la prevención o el tratamiento de enfermedades respiratorias genéticas, que comprenden la etapa de administración de un vector lentivírico de la presente invención a un individuo. La presente divulgación se refiere a métodos de prevención o tratamiento en los que la enfermedad  
15 respiratoria genética anteriormente mencionada es la fibrosis quística. Por otra parte, la presente divulgación se refiere a usos de vectores de SIV recombinantes de la presente invención para la producción de agentes terapéuticos para enfermedades respiratorias genéticas. La presente divulgación también se refiere a su uso para la producción de agentes terapéuticos, en el que la enfermedad respiratoria genética anteriormente mencionada es la fibrosis quística.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de la porción limítrofe entre el dominio citoplasmático del SIV (parte subrayada y en cursiva) y el dominio transmembrana de la proteína HN (en cursiva) de  
25 una proteína codificada por un plásmido de expresión de HN sustituido con el dominio citoplasmático.

La Figura 2 representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la porción limítrofe entre el dominio citoplasmático (parte subrayada y en cursiva) y el dominio transmembrana de la proteína HN (en redonda) de una proteína codificada por un plásmido de expresión de HN añadido al dominio citoplasmático del SIV.

30 La Figura 3 representa las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 3 y 5) de la porción limítrofe entre el dominio transmembrana de la proteína F (en cursiva) y el dominio citoplasmático de la proteína F (en redonda) de proteínas codificadas por plásmidos de expresión de F suprimidos del dominio citoplasmático.

35 La Figura 4 representa las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 6 y 8) de la porción limítrofe del dominio transmembrana de la proteína F (en cursiva sin subrayar), el dominio citoplasmático de la proteína F (en redonda) y 11 aminoácidos del dominio citoplasmático del SIV (SIV<sub>c11</sub>) (parte subrayada y en cursiva) de proteínas codificadas por un plásmido de expresión de F suprimido del dominio citoplasmático al que se le ha añadido el dominio citoplasmático del SIV.

40 La Figura 5 muestra fotografías que indican la expresión génica a largo plazo en la cavidad nasal de ratón mediante un vector del SIV pseudotipado con F/HN de la presente invención. Se muestran los resultados del día 3 al día 360. Los números entre paréntesis (x/x) indican el número de ratones individuales que presentan expresión génica/número de ratones individuales sometidos a ensayo. Cuando los valores numéricos se encuentran separados  
45 a izquierda y a derecha, el lado izquierdo muestra el número de ratones individuales que indican una fuerte expresión de la GFP, y el lado derecho muestra el número de ratones individuales usados para el análisis cada día. La escala gráfica representa 5 mm.

La Figura 6 muestra fotografías que indican que se observó una transferencia génica específica excelente en el  
50 epitelio de la cavidad nasal de ratón debido a un vector del SIV pseudotipado con F/HN de la presente invención. Se muestran los resultados del día 36 y del día 50. La escala gráfica representa 0,5 mm.

La Figura 7 es una continuación de las fotografías de la Figura 6. Muestran la expresión que se observó los días  
55 160, 220, y 360, que supera el tiempo de supervivencia de las células.

La Figura 8 es un diagrama esquemático que representa el movimiento de células diferenciadas en el tejido epitelial cuando los citoblastos se encuentran presentes en sus nichos (derecha) y cuando los citoblastos se encuentran dispersas en torno a la membrana basal de las células epiteliales (izquierda). SMG se refiere a la glándula submucosa. La vista en cuatro planos en la parte inferior muestra la superficie apical del epitelio de las vías

respiratorias. La vista inferior en dos planos representa el resultado después de dos ciclos de división de citoblastos (aproximadamente 180 días después). Cuando los citoblastos alcanzan una cierta proporción, las células diferenciadas se mueven rápidamente en dirección lateral. La regeneración celular tiene lugar en intervalos de tres meses. En la figura, los círculos a rayas (sombreados) indican citoblastos, los círculos blancos representan células progenitoras epiteliales de las vías respiratorias, los círculos grises representan células epiteliales de las vías respiratorias en proceso de diferenciación, y los círculos negros representan células epiteliales de las vías respiratorias diferenciadas.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

10

Los presentes inventores construyeron vectores sometidos a pseudotipado con proteínas espina de virus de ARN de la hebra no codificante usando un virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) seleccionado entre lentivirus que se espera usar como vectores de terapia génica. El virus de la inmunodeficiencia de simios presenta diversas ventajas tales como una alta seguridad en comparación con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) usado de forma convencional en el ámbito de la terapia génica. Por ejemplo, se construyeron vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios sometidos a pseudotipado con las proteínas F y HN del virus Sendai, un virus de ARN de la hebra no codificante, como se describe a continuación en los ejemplos. Por otra parte, se introdujeron con éxito genes exógenos en citoblastos de la cavidad nasal de ratón usando estos vectores.

15

20 Más específicamente, la presente descripción describe vectores lentivíricos sometidos a pseudotipado con proteínas espina de virus de ARN o virus de ADN (de aquí en lo sucesivo, estos vectores se pueden denominar "vectores lentivíricos pseudotipados" o simplemente "vectores") para la introducción de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias.

25 Los "vectores lentivíricos" son partículas víricas que contienen un genoma vírico derivado de lentivirus, carecen de capacidad de auto-renovación, y tienen la capacidad de introducir una molécula de ácidos nucleicos en un hospedador. Específicamente, estos vectores presentan una estructura lentivírica. La frase "presenta una estructura lentivírica" significa que la molécula de ácidos nucleicos incluida en las partículas víricas que constituyen los vectores está basada en un genoma lentivírico. Por ejemplo, los vectores lentivíricos incluyen vectores en los que una molécula de ácidos nucleicos contenida en partículas víricas contiene una secuencia de señalización de encapsidación derivada de genoma lentivírico. Por otra parte, "vectores víricos recombinantes" en la presente descripción se refiere a vectores víricos construidos mediante técnicas de recombinación genética. Los vectores víricos construidos usando células de encapsidación y ADN que codifican un genoma vírico se denominan vectores víricos recombinantes.

30

"Lentivirus" se refiere a retrovirus que pertenecen a la subfamilia de lentivirus. Como lentivirus se incluyen virus como los siguientes.

35

virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (por ejemplo, VIH1 o VIH2);

40

virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV);

virus de la inmunodeficiencia felina (FIV);

45

Virus de tipo Maedi-Visna (EV1);

virus de la anemia infecciosa equina (VAIE); y

virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV).

50

Tal como se describe en el presente documento, se pueden usar vectores lentivíricos derivados de cualquier cepa o subtipo. Por ejemplo, como VIH1, se incluyen todos los subtipos principales (M) que incluyen de A a J, N, y los atípicos (O) (Hu, D. J. et al., JAMA 1996; 275: 210-216; Zhu, T. et al., Nature 1998, 5; 391 (6667): 594-7; Simon, F. et al., Nat. Med. 1998, 4 (9): 1032-7). La presente invención, tal como se reivindica, se refiere a vectores lentivíricos

55

derivados del SIV.

La frase "vectores lentivíricos sometidos a pseudotipado con proteínas espina de virus de ARN" se refiere a vectores lentivíricos que contienen proteínas espina de virus de ARN. También se refiere a vectores lentivíricos que llevan una o más proteínas espina de virus de ARN que no se encuentran en la forma natural de los vectores lentivíricos.

La frase "vectores lentivíricos pseudotipados con proteínas espina de virus de ADN" se refiere a vectores lentivíricos que contienen proteínas espina de virus de ADN. También se refiere a vectores lentivíricos que llevan una o más proteínas espina de virus de ADN que no se encuentran en la forma natural de los vectores lentivíricos.

5 En la presente invención, el término "citoblasto epitelial de las vías respiratorias" que se convierte en un objetivo de la transferencia génica se refiere a un citoblasto presente en tejidos epiteliales de las vías respiratorias. Los citoblastos son células sin diferenciar que son multipotentes y tienen capacidad de auto-renovación. Se conocen tres tipos: citoblastos hematopoyéticos, citoblastos mesenquimales (células estromales de médula ósea: D. J. Prockop, Science, 276, 71-74, 1997), y citoblastos presentes en tejidos de diversos órganos. Además, el término "tejidos  
10 epiteliales de las vías respiratorias" se refiere, por ejemplo, a tejidos de la nariz, de la cavidad nasal, la faringe, laringe, tráquea, bronquios, pulmones y similares. Los tejidos epiteliales de las vías respiratorias preferidos en la presente invención son la cavidad nasal, la tráquea, y los pulmones. Por otra parte, los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias de la presente invención no están limitados a citoblastos presentes en las glándulas de la submucosa. Específicamente, los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias se pueden definir como todos los  
15 citoblastos hematopoyéticos, citoblastos mesenquimales, y citoblastos en tejidos de diversos órganos que se pueden diferenciar en tejidos epiteliales de las vías respiratorias.

Los vectores lentivíricos pseudotipados tienen la función de introducir genes en los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias. Específicamente, los virus de ARN o virus de ADN usados para el pseudotipado en la presente  
20 invención preferentemente tienen la función de infectar tejidos epiteliales de las vías respiratorias.

El término "virus de ARN" se refiere a un virus que contiene un genoma de ARN. Los virus de ARN en la presente invención preferentemente son virus que sintetizan ARN durante su ciclo de vida usando ARN como molde. Los virus de ARN de forma deseable pueden ser virus de ARN que repliquen ARN genómicos en células epiteliales de las vías  
25 respiratorias, y pueden ser virus de tipo silvestre, o virus mutantes tales como virus atenuados, virus sensibles a la temperatura y similares. Por otra parte, pueden ser virus naturales (virus de origen natural) o virus recombinantes. Los virus de ARN incluyen virus de ARN de cadena sencilla (incluidos virus de ARN de la hebra codificante y virus de ARN de la hebra no codificante) y virus de doble cadena. También incluyen virus con envoltura (virus encapsulados) y virus sin envoltura (virus no encapsulados), pero preferentemente, se usan virus con envoltura. Los  
30 virus de ARN incluyen específicamente virus que pertenecen a las siguientes familias:

*Arenaviridae* tales como el virus Lassa;

*Orthomyxoviridae* tales como el virus de la gripe;

35 *Coronaviridae* tales como el coronavirus del SRAS;

*Togaviridae* tales como el virus de la rubéola;

40 *Paramyxoviridae* tales como el virus de las paperas, el virus del sarampión, el virus Sendai, y el virus RS;

*Picornaviridae* tales como el poliovirus, el virus Coxsackie, y echovirus;

*Filoviridae* tales como el virus de Marburg y el virus de la fiebre hemorrágica del Ébola;

45 *Flaviviridae* tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus de la fiebre del dengue, el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis G;

*Bunyaviridae*;

50 *Rhabdoviridae* tales como el virus de la rabia; y

*Reoviridae*.

55 El término "virus de ARN de la hebra codificante" se refiere a virus que contienen ARN de la hebra codificante como genoma. De ellos, preferentemente se usa el coronavirus del SRAS (virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y nuevos tipos de coronavirus) de *Coronaviridae*.

Los virus de ARN de la hebra codificante incluyen, por ejemplo, los siguientes:

*Coronaviridae* tales como el virus del SARS;

*Caliciviridae* tales como el norovirus;

5

*Picornaviridae*;

*Astroviridae* tales como el astrovirus;

10 *Togaviridae*;

*Flaviviridae*;

*Retroviridae* tales como el virus de la inmunodeficiencia humana; y

15

*Bunyaviridae*.

Por otra parte, el término "virus de ARN de la hebra no codificante" se refiere a un virus que contiene un ARN de la hebra no codificante (hebra inversa de la hebra sentido que codifica las proteínas víricas) como genoma. Un ARN de la hebra no codificante también se denomina ARN inverso. Los virus de ARN de la hebra no codificante usados incluyen en particular virus de ARN de la hebra no codificante de cadena sencilla (también denominados virus de ARN de la hebra no codificante no segmentados). El término "virus de ARN inverso de cadena sencilla" se refiere a virus que contienen un ARN inverso de cadena sencilla (es decir, hebra no codificante) como genoma.

20

25 Los virus de ARN de la hebra no codificante anteriormente mencionados incluyen virus que pertenecen a *Paramyxoviridae* (incluyendo los géneros *Paramyxovirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus*, y *Pneumovirus*), *Rhabdoviridae* (incluyendo los géneros *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, y *Ephemerovirus*), *Filoviridae* incluyendo virus de la fiebre hemorrágica del Ébola, *Orthomyxoviridae* (incluyendo virus de la gripe A, B, y C, y virus de tipo Thogoto), *Bunyaviridae* (incluyendo los géneros *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus*), *Arenaviridae* y similares.

30

Ejemplos específicos de virus de ARN de la hebra no codificante incluyen el virus Sendai, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de las paperas, el virus del sarampión, virus sincitial respiratorio (virus RS), el virus de la peste bovina, el virus del moquillo, el virus de la parainfluenza de simios (SV5), y el virus de la parainfluenza humana I, II, y III, que son virus *Paramyxoviridae*; el virus de la gripe que pertenece a *Orthomyxoviridae*; el virus de la estomatitis vesicular y el virus de la rabia que pertenece a *Rhabdoviridae*; y el virus del Ébola que pertenece a *Filoviridae*. De ellos, preferentemente se usan el virus Sendai, el virus de la gripe, y el virus de Ébola. Según la presente invención, tal como se reivindica, se usa el virus Sendai.

35

El virus Sendai incluye la cepa de tipo silvestre, las cepas mutantes, cepas pasadas por laboratorio, y cepas establecidas artificialmente. Como materiales para la producción de vectores lentivíricos pseudotipados de la presente invención también se pueden usar virus defectuosos tales como partículas DI (J. Virol. 68, 8413-8417 (1994)), oligonucleótidos sintetizados y similares.

40

Las "proteínas espina" también se pueden denominar proteínas de la envoltura. Específicamente, el término "proteínas espina" se refiere a proteínas que sobresalen dispuestas sobre la superficie de la envoltura de un virus, que son glicoproteínas víricas y pueden existir como multímeros. Desempeñan un papel indispensable en la unión e invasión de virus con envoltura en células hospedadoras. Por ejemplo, los dos tipos de proteínas espina en el virus Sendai son la glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y la glicoproteína de fusión (F). En el virus de la gripe, hay dos tipos de proteínas espina, la hemaglutinina (trímero) (HA) y la neuraminidasa (tetramero) (NA). En virus del SARS, la glicoproteína espina existe en forma de proteína espina. En la cepa Zaire del virus de la fiebre hemorrágica del Ébola, como proteína espina existe la proteína de la envoltura EboZ, una proteína que sobresale de aproximadamente 10 nm de longitud.

45

50

Las proteínas espina no están limitadas a las proteínas espina mencionadas anteriormente tales como HN, F, HA, N, y EboZ; y por ejemplo, también se incluyen las proteínas en otros virus de ARN o virus de ADN que corresponden a las proteínas espina anteriormente mencionadas, incluso si los nombres difieren. La presente invención, tal como se reivindica, se refiere a las proteínas espina F y HN del virus Sendai. Estas proteínas espina se pueden modificar con una o más sustituciones, eliminaciones, inserciones y/o adiciones de aminoácidos a proteínas naturales, siempre que se mantengan las funciones de las proteínas originales. El número de aminoácidos que se puede modificar no

55

está limitado en particular; no obstante, en general es de 50 aminoácidos o inferior, preferentemente de 30 aminoácidos o inferior, y más preferentemente de 10 aminoácidos o inferior (por ejemplo, cinco aminoácidos o inferior, o tres aminoácidos o inferior). Las modificaciones de aminoácidos preferentemente son sustituciones conservativas. La presente divulgación también incluye vectores lentivíricos pseudotipados con proteínas que  
5 comprenden dichos aminoácidos modificados.

Los vectores lentivíricos pseudotipados se pueden producir para que tengan proteínas espina presentes en el momento de la producción del virus. Por ejemplo, mediante la expresión de espinas en células de encapsidación por transfección de un vector de expresión de espinas o mediante la inducción de expresión de genes espina  
10 incorporados en el ADN cromosómico del hospedador, las partículas víricas producidas a partir de estas células se convierten en pseudotipadas con las proteínas espina.

Por otra parte, la presente divulgación se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que los virus de ARN son paramixovirus.

15 Ejemplos conocidos de genes que codifican proteínas víricas de paramixovirus son los genes NP, P, M, F, HN, y L. Los genes "NP, P, M, F, HN, y L" se refiere a genes que codifican proteínas de la nucleocápsida, fosfoproteínas, proteínas de la matriz, proteínas de fusión, hemaglutinina-neuraminidasa y proteínas grandes, respectivamente. Los genes de los virus que pertenecen a la subfamilia paramixovirus generalmente se describen como se indica a  
20 continuación. En general, el gen NP también se puede denominar "gen N".

Género *Paramyxovirus*. NP P/C/V M F HN - L

25 Género *Rubulavirus*. NP P/V M F HN (SH) L

Género *Morbillivirus*. NP P/C/V M F H - L

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de cada gen en el virus Sendai, que pertenece al género *Paramyxovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tiene los números de acceso en la base de datos de la siguiente manera: M29343,  
30 M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, y X17218 para el gen NP; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007 y X17008 para el gen P; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584 y X53056 para el gen M; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152 y X02131 para el gen F; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808 y X56131 para el gen HN; y D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587 y X58886 para el gen L.  
35

Un vector lentivírico pseudotipado con una proteína de la envoltura de paramixovirus se puede producir, por ejemplo, preparando un paramixovirus inactivado o un virosoma que contiene una proteína de la envoltura de un paramixovirus, y a continuación fusionándolo con un lentivirus. Como alternativa, se puede producir expresando un vector de expresión para la expresión de la proteína de la envoltura del paramixovirus en una célula de  
40 encapsidación lentivírico.

Además, la presente invención, tal como se reivindica, se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que el paramixovirus es el virus Sendai.

45 La presente divulgación también se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que los virus de ARN de la hebra no codificante son ortomixovirus.

Los virus *Orthomyxoviridae* incluyen los géneros *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* y *Thogotovirus*. Un *Influenzavirus A* incluye el virus de la gripe A (FLUAV), un *Influenzavirus B* incluye el virus de la gripe B (FLUBV),  
50 un *Influenzavirus C* incluye el virus de la gripe C (FLUCV), y un *Thogotovirus* incluye el virus Thogoto (THOV) y el virus Dhori (DHOV).

Ejemplos conocidos de genes que codifican proteínas víricas de ortomixovirus son los genes HA, NA, y M1. Los "genes HA, NA, y M1" se refiere a genes que codifican la hemaglutinina, neuraminidasa, y proteínas de la matriz  
55 (membrana), respectivamente. Los genes de virus que pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* se describen generalmente como se indica a continuación. En general, el gen HA también se puede denominar H, y el gen de NA se puede denominar N.

Género *Influenzavirus A*. PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1+M2, NS1+NS2

Género *Influenzavirus* B. PB2, PB1, PA, HA, NP, NA+NB, M1+M2, NS1+NS2

Género *Influenzavirus* C. PB2, PB1, P3 (PA), SE (HA), NP, M, NS1+NS2

5

Género *Thogotovirus*. PB2, PB1, PA, GP-75 (THOV), GP-64 (DHOV), NP, M

Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de genes de la envoltura del virus de la gripe A que pertenece al género *Influenzavirus* A de *Orthomyxoviridae* tienen números de acceso en la base de datos de la siguiente manera:

10 NC\_002017 para el gen HA y NC\_002018 para el gen de NA.

Las secuencias de nucleótidos de genes de la envoltura del virus de la gripe B que pertenece al género *Influenzavirus* B tienen números de acceso de la siguiente manera: NC\_002207 para el gen HA y NC\_002209 para el gen de NA.

15

La secuencia de nucleótidos de un gen de la envoltura del virus de la gripe C que pertenece al género *Influenzavirus* C tiene el número de acceso NC\_006310 para el gen HE (precursor de hemaglutinina-esterasa) en la base de datos.

La secuencia de nucleótidos de un gen de la envoltura del virus de Dhori que pertenece al género *Thogotovirus* tiene el número de acceso NC\_006506 para el gen GP-64 en la base de datos.

20

Además, la presente divulgación se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que los ortomixovirus son virus de la gripe.

25 La presente divulgación también se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que los virus de ARN de la hebra no codificante son filovirus.

*Filoviridae* incluye los virus del género de tipo Marburg, y los virus del género de tipo Ébola. Los virus del género de tipo Marburg incluyen el virus de Marburg, y los virus del género de tipo Ébola incluyen la cepa Zaire, la cepa Reston, y la cepa Sudán del virus de la fiebre hemorrágica del Ébola. Cualquiera de las cepas mencionadas anteriormente se puede utilizar como virus de la fiebre hemorrágica del Ébola.

30

Preferentemente se utiliza la cepa Zaire del virus de la fiebre hemorrágica del Ébola.

35 Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de genes que codifican proteínas víricas del virus de la fiebre hemorrágica del Ébola en la base de datos tienen los números de acceso NC\_002549, L11365, AF086833, AF272001, U28077, U31033, y AY142960.

40 Además, la presente divulgación se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que el filovirus es el virus de la fiebre hemorrágica del Ébola.

La presente divulgación también se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que los virus de ARN de la hebra codificante son coronavirus.

45 *Coronaviridae* incluye el género *Coronavirus* y el género *Torovirus*. Ejemplos del género *Coronavirus* incluyen el virus del SARS, el virus de la bronquitis infecciosa, coronavirus humano, y el virus de la hepatitis murina, y ejemplos del género *Torovirus* incluyen torovirus equino y torovirus humano.

50 Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican las proteínas víricas del virus del SARS en la base de datos tienen los números de acceso NP\_828851 para una proteína espina y NC\_004718.

Además, la presente divulgación se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que el coronavirus es el virus del SARS.

55 La presente divulgación también se refiere a vectores lentivíricos pseudotipados en los que los virus de ADN son baculovirus. Dado que las proteínas espina de baculovirus tienen similitudes estructurales con las proteínas espina del virus D de la gripe tales como Thogoto, se ha sugerido que los baculovirus pueden infectar el epitelio de las vías respiratorias (Sinn, PL, Burnight, ER, Hickey, MA, Blissard, GW, y McCray, PB, Jr. Persistent gene expression in mouse nasal epithelia following feline immunodeficiency virus-based vector gene transfer. *J. Virol.* (2005) 79: 12818-

12827). Los baculovirus incluyen, por ejemplo, *Autographa californica*.

Por ejemplo, cuando los virus de ARN de la hebra no codificante son paramixovirus, los vectores lentivíricos de la presente invención pseudotipados con proteínas espina del virus de ARN o virus de ADN comprenden preferentemente la proteína HN y la proteína F. Cuando los virus de ARN de la hebra no codificante son ortomixovirus, los vectores comprenden preferentemente no solo la proteína HA, sino también la proteína NA, la proteína GP88, o HE. Cuando los virus de ARN son coronavirus, los vectores comprenden preferentemente la proteína S. Cuando los virus de ARN son filovirus, los vectores comprenden preferentemente proteínas de la envoltura.

10

En la presente invención, se demostró que los vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios pseudotipados que contienen las proteínas HN y F del virus Sendai muestran una alta eficiencia de transferencia génica en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias. Específicamente, los vectores lentivíricos de la presente invención incluyen vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios pseudotipados que contienen las proteínas F y HN.

15 Además, los vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios pseudotipados de la presente invención adicionalmente pueden contener la proteína M de paramixovirus.

El virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) fue descubierto como un tipo de virus del VIH derivado de mono. Junto con el VIH, el SIV forma el grupo de lentivirus de primates (E. Ido y M. Hayamizu, "Gene, Infection and Pathogenicity of Simian Immunodeficiency Virus", Protein, Nucleic acid and Enzyme, Vol. 39, No. 8, p. 1425, 1994). Este grupo se divide en cuatro subgrupos:

(1) el subgrupo VIH-1: que incluye el VIH-1, el virus que causa el síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida (sida), y el SIVcpz aislado de chimpancés;

25

(2) el subgrupo VIH-2: que incluye el SIVsmm aislado de mangabey gris (*Cercocebus atys*), el SIVmac aislado de monos rhesus (*Macaca mulatta*), y el VIH-2, que es menos patogénico en seres humanos (Jaffar, S. et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 16(5), 327-32, 1997);

30 (3) el subgrupo SIVagm: representado por SIVagm aislado de monos verdes africanos (*Cercopithecus aethiops*); y

(4) el subgrupo SIVmnd: representado por SIVmnd aislado de mandriles (*Papio sphinx*).

El SIV en la presente invención incluye todas las cepas y subtipos del SIV. Ejemplos de cepas del SIV aislados incluyen SIVagm, SIVcpz, SIVmac, SIVmnd, SIVsm, SIVsnm y SIVsyk.

No hay información acerca de la patogenicidad del SIVagm y SIVmnd en hospedadores naturales (Ohta, Y. et al., Int. J. Cancer, 15, 41(1), 115-22, 1988; Miura, T. et al., J. Med. Primatol., 18 (3-4), 255-9, 1989; M. Hayamizu, Nippon Rinsho, 47, 1, 1989). En particular, los informes de experimentos de infección sugieren que la cepa TYO-1 del virus SIVagm no es patógena para macacos (*Macaca fascicularis*) y monos rhesus (*Macaca mulatta*), además de sus hospedadores naturales (Ali, M. et al. Gene Therapy, 1 (6), 367-84, 1994; Honjo, S et al., J. Med. Primatol., 19 (1), 9-20, 1990). No hay información acerca de la infección, patogenicidad o actividad patógena del SIVagm en seres humanos. En general, los lentivirus de primates tienen una especificidad de especie estricta, y hay pocos informes de infecciones entre especies o patogénesis de hospedadores naturales. Cuando se produce la infección entre especies, la frecuencia de aparición de la enfermedad suele ser baja, y el progreso de la enfermedad es lento (Novembre, F.J. et al., J. Virol., 71 (5), 4086-91, 1997). En consecuencia, preferentemente en la presente invención se usa el SIV derivado de la cepa agm. Además, se cree que los vectores víricos basados en la cepa TYO-1 del SIVagm son más seguros que los vectores basados en el VIH-1 u otros lentivirus, y por lo tanto se prefieren para su uso en la presente invención.

50

Los vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios pseudotipados de la presente invención además pueden contener proteínas de la envoltura derivadas de otros virus. Por ejemplo, como dichas proteínas se prefieren las proteínas de la envoltura derivadas de virus que infectan las células humanas. Dichas proteínas incluyen, pero no se limitan en particular a, proteínas de la envoltura anfotrópicas retrovíricas. Por ejemplo, las proteínas de la envoltura derivadas de la cepa 4070A del virus de la leucemia murina (MuLV) se pueden utilizar como proteínas de la envoltura anfotrópicas retrovíricas. Como alternativa, también se pueden utilizar proteínas de la envoltura derivadas de MuLV 10A1 (por ejemplo, pCL-10A1 (Imgenex) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)). Otros ejemplos incluyen la glicoproteína de la envoltura (GP) de la cepa Zaire del virus de la fiebre hemorrágica del Ébola y la proteína espina de la envoltura (proteína S) del virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) identificado

como un nuevo tipo de coronavirus. Ejemplos de proteínas de la *Herpesviridae* incluyen las proteínas GB, GD GH y gp85 del virus del herpes simple, y las proteínas gp350 y gp220 del virus EB. Las proteínas de la *Hepadnaviridae* incluyen la proteína S del virus de la hepatitis B.

- 5 Los vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios de la presente invención pueden contener una porción de una secuencia de ARN genómico derivado de otro retrovirus. En los vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios de la presente invención también se incluyen vectores que comprenden una secuencia quimérica, que resulta de la sustitución de una porción del genoma del virus de la inmunodeficiencia de simios con, por ejemplo, una porción de la secuencia genómica de otros lentivirus tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) (Poeschla, E. M. et al., *Nature Medicine*, 4 (3), 354-7, 1998) o la artritis-encefalitis caprina virus (CAEV) (Mselli-Lakhal, L. et al., *Arch. Virol.*, 143 (4), 681-95, 1998).

En retrovirus, también se puede modificar la LTR (repetición terminal larga). La LTR es una secuencia específica del retrovirus, que está presente en ambos extremos del genoma vírico. La LTR 5' sirve como promotor, mejorando la transcripción provírica del ARNm. Por lo tanto, es posible mejorar la transcripción del ARNm del vector de transferencia de genes, mejorar la eficiencia de la encapsidación, y aumentar la titulación del vector si la parte que presenta la actividad promotora LTR 5' en el vector de transferencia génica está sustituida con otro promotor más fuerte que tenga actividad promotora. Además, por ejemplo, en el caso de lentivirus, la proteína vírica *tat* es conocida por mejorar la actividad de transcripción de LTR 5', y por lo tanto, la sustitución de LTR 5' con un promotor independiente de la proteína *tat* permitirá la exclusión de *tat* de los vectores de encapsidación. Después de que se haya producido la transcripción inversa de los ARN de virus que han infectado o invadido las células, las LTR en ambos extremos se unen para formar una estructura circular cerrada, la integrasa vírica se acopla en el sitio de unión, y a continuación esta estructura se integra en los cromosomas celulares. Los ARNm províricos transcritos constan de la región que va desde el sitio de iniciación de la transcripción LTR 5' a la secuencia LTR 3' poliA situada aguas abajo. La porción promotora LTR 5' no está encapsidada en el virus. Así, incluso si el promotor se sustituye con otra secuencia, la porción integrada en los cromosomas celulares diana permanece inalterada. Basándose en el hecho descrito anteriormente, se cree que la sustitución del promotor de LTR 5' proporciona un vector más seguro con una titulación más elevada. Así, la sustitución del promotor en el extremo 5' de un vector de transferencia génica puede incrementar la titulación del vector encapsidable.

- 30 Se puede mejorar la seguridad en vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios recombinante al impedir la transcripción del ARNm del vector de longitud completa. Esto se consigue usando un vector auto-inactivante (vector SIN) preparado eliminando parcialmente la secuencia LTR 3'. El provirus del lentivirus que ha invadido los cromosomas de la célula diana tiene un extremo 5' unido a la porción U3 de su LTR 3'. Así, la porción U3 está localizada en el extremo 5' en el vector de transferencia génica, y a partir de ese punto se transcribe el ARN completo del vector de transferencia génica. Si hay lentivirus o proteínas similares en las células diana, es posible que el vector de transferencia génica se vuelva a re-encapsidar e infectar otras células. También existe la posibilidad de que el promotor LTR 3' puede expresar genes hospedadores localizados en el lado 3' del genoma vírico (Rosenberg, N., Jolicoeur, P., *Retroviral Pathogenesis. Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 475-585, 1997). Estos acontecimientos ya se consideran problemas de los vectores retrovíricos, y el vector SIN se desarrolló como forma de superar estos problemas (Yu, S. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (10), 3194-8, 1986). Cuando la porción U3 de la LTR 3' se elimina de un vector de transferencia génica, las células diana carecen de promotores de LTR 5' y LTR 3', impidiendo así la transcripción del ARN vírico de longitud completa y los genes del hospedador. Por otra parte, puesto que solo se transcriben los genes de interés a partir de promotores endógenos, cabe esperar vectores muy seguros capaces de una alta expresión. Dichos vectores se prefieren en la presente invención. Los vectores SIN se pueden construir de acuerdo con métodos conocidos.

Un problema encontrado en terapia génica usando vectores víricos que tienen la secuencia LTR en su genoma, incluidos vectores retrovíricos, es una reducción gradual en la expresión de un gen introducido. Uno de los factores puede ser que cuando dicho vector se integra en el genoma del hospedador, un mecanismo del hospedador metila la LTR para suprimir la expresión del gen introducido (Challita, P. M. and Kohn, D. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2567, 1994). Una ventaja de los vectores sin es que la metilación de LTR apenas reduce el nivel de expresión génica. Esto se debe a que el vector pierde la mayoría de la secuencia LTR tras su integración en el genoma del hospedador. Se comprobó que un vector SIN preparado al sustituir otra secuencia promotora por la región U3 de la LTR 3' de un vector de transferencia génica mantiene una expresión estable durante más de dos meses después de la introducción en células de primate ES (documento WO 02/101057). Así, un vector SIN diseñado para auto-inactivarse por la modificación de la región U3 de la LTR es adecuado en particular en la presente invención.

Ejemplos de vectores lentivíricos aparte de los vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios anteriormente

mencionados incluyen los vectores del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), los vectores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, por ejemplo VIH1 o VIH2) y los vectores del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV).

- 5 Un riesgo que se ha señalado en relación a los vectores de lentivirus tales como los vectores del VIH es que si el genoma del hospedador ya presenta un provirus del VIH, se puede producir la recombinación entre un vector exógeno y el provirus endógeno, dando lugar a la producción de virus competentes para su replicación. Se prevé que esto sea un problema grave en el futuro, cuando se usen vectores del VIH en pacientes con el VIH. Los vectores del SIV usados en la presente invención presentan una baja homología de secuencia con el VIH, y no son
- 10 competentes para su replicación debido a que se ha eliminado el 80,6 % de la secuencia derivada del virus de los vectores. Así, estos vectores apenas plantean este riesgo y son más seguros que los otros vectores lentivíricos. Por consiguiente, de estos vectores lentivíricos, en la presente invención se usan vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV).
- 15 Los vectores del SIV preferidos de la presente invención son virus no competentes para su replicación de los que se ha eliminado el 40 % o superior, más preferentemente el 50 % o superior, incluso más preferentemente el 60 % o superior, aún más preferentemente el 70 % o superior, y lo más preferentemente el 80 % o superior de la secuencia derivada del genoma del SIV original.
- 20 Los retrovirus se pueden producir transcribiendo en ADN de vectores de transferencia de genes de células hospedadoras que contienen una señal de encapsidación y que forman partículas víricas en presencia de proteínas gag, pol y de la envoltura. La secuencia de la señal de encapsidación codificada por los ADN del vector de transferencia de genes preferentemente debe ser de longitud suficiente para mantener la estructura formada por la secuencia. No obstante, para suprimir la frecuencia de formación de virus de tipo silvestre, que se produce debido a
- 25 la recombinación de la señal de encapsidación del ADN del vector y el vector de encapsidación que suministra las proteínas gag y pol, también es necesario mantener al mínimo el solapamiento de secuencia entre estas secuencias del vector. Por tanto, cuando se trata de la construcción de los ADN del vector de transferencia génica, es preferible usar una secuencia que sea tan corta como sea posible pero que aun así contenga la secuencia esencial para la encapsidación, para garantizar la eficacia y seguridad de la encapsidación.
- 30 Por ejemplo, en el caso del vector de encapsidación derivado del SIVagm, el tipo de virus a usar del cual deriva la señal se puede limitar al SIV, porque los vectores del VIH no se encapsidan. Sin embargo, un vector de transferencia de genes derivado del SIV también es encapsidable cuando se utiliza un vector de encapsidación derivado del VIH. Por lo tanto, se puede reducir la frecuencia de formación de virus recombinante si las partículas del
- 35 vector se forman mediante la combinación de un vector de transferencia de genes y un vector de encapsidación, en el que cada vector procede de un tipo diferente de lentivirus. Los vectores del SIV producidos de este modo también se incluyen en los vectores de esta invención. En estos casos, es preferible utilizar combinaciones de lentivirus de primates (por ejemplo, VIH y SIV).
- 40 En un ADN preferido del vector de transferencia génica, la proteína gag se ha modificado de tal manera que no se exprese. La proteína gag vírica puede ser detectada por un cuerpo vivo como una sustancia extraña, y por lo tanto como un antígeno potencial. Como alternativa, la proteína puede afectar a las funciones celulares. Para evitar la expresión de proteínas gag, se pueden añadir o eliminar los nucleótidos en dirección 3' del codón de iniciación de gag, introduciendo modificaciones que provocarán un desplazamiento del marco de lectura. También es preferible
- 45 eliminar porciones de la región codificante de la proteína gag. Se sabe que la porción 5' de la región codificante de la proteína gag es esencial para la encapsidación del virus. Así, en un vector de transferencia génica, es preferible que se haya eliminado el lado C-terminal de la región codificante de la proteína gag. Es preferible suprimir una porción de la región codificante de gag tan grande como sea posible, siempre y cuando la eliminación no afecte considerablemente a la eficiencia de la encapsidación. También es preferible sustituir el codón de iniciación (ATG)
- 50 de la proteína gag con un codón distinto de ATG. El codón de sustitución se puede seleccionar de forma conveniente a fin de no afectar en gran medida la eficiencia de la encapsidación. Se puede producir un vector vírico mediante la introducción del ADN del vector de transferencia de genes construido, que comprende la señal de encapsidación, en células de encapsidación apropiadas. El vector vírico producido se puede recuperar, por ejemplo, del sobrenadante del cultivo de células de encapsidación.
- 55 No hay limitación en cuanto al tipo de célula de encapsidación, siempre y cuando en general se use la línea celular en la producción del virus. Cuando se utiliza para terapia génica humana, es adecuada una célula derivada de un ser humano o de mono. Las líneas celulares humanas que se pueden usar como células de encapsidación incluyen, por ejemplo, células 293, células 293T, células 293EBNA, células SW480, células U87MG, células HOS, células

C8166, células MT-4, células Molt-4, células HeLa, células HT1080, y células TE671. Las líneas celulares de mono incluyen, por ejemplo, células COS1, células COS7, células CV-1 y células BMT10.

5 El tipo de gen exógeno a transportar por los vectores lentivíricos pseudotipados de la presente invención no está limitado. Dichos genes incluyen ácidos nucleicos que codifican proteínas y los que no codifican proteínas, por ejemplo, ácidos nucleicos antisentido y ribozimas. Los genes pueden tener una secuencia natural o una diseñada artificialmente. Proteínas artificiales incluyen proteínas de fusión con otras proteínas, proteínas dominantes negativas (incluyendo moléculas de receptores solubles y receptores negativos dominantes unidos a membrana), moléculas de adhesión celular truncadas, y moléculas de la superficie celular solubles.

10 Los presentes inventores confirmaron que los vectores de SIV recombinantes pseudotipados de la presente invención expresan genes exógenos durante un largo periodo de tiempo en las células epiteliales de las vías respiratorias incluidos los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias y células progenitoras epiteliales de las vías respiratorias. Específicamente, los vectores lentivíricos pseudotipados de la presente invención tienen la capacidad  
15 de expresar genes exógenos en células epiteliales de las vías respiratorias durante al menos 90 días o superior, y más preferentemente de 360 días o superior.

Los genes exógenos en la presente invención pueden ser genes marcadores para evaluar la eficiencia de la transferencia génica, la estabilidad de la expresión, etc. Los genes marcadores incluyen genes que codifican la  
20 proteína verde fluorescente (de aquí en lo sucesivo también denominada "GFP"), la beta-galactosidasa, y la luciferasa. En particular es preferible el gen que codifica la GFP.

Además, los genes exógenos en la presente invención pueden ser genes que codifican una proteína disfuncional inherente o adquirida. En el presente documento, la frase "disfuncional inherente" se refiere a que es disfuncional de  
25 forma innata debido a factores genéticos, y la frase "disfuncional adquirida" se refiere a que es disfuncional debido a factores medioambientales después del nacimiento.

Por ejemplo, en el caso de la fibrosis quística (FQ) sus ejemplos incluyen genes que codifican factores (proteínas) causantes de la fibrosis quística disfuncional inherente o adquirida, y preferentemente genes que codifican proteínas  
30 reguladoras de la conductancia transmembranosa de la fibrosis quística (CFTR) disfuncional inherente o adquirida.

Como alternativa, ejemplos de genes exógenos en la presente invención incluyen genes que codifican proteínas que tienen efectos terapéuticos sobre la fibrosis quística.

35 Por el contrario, ejemplos de genes exógenos en la presente invención pueden ser genes que codifican proteínas que se han vuelto disfuncionales debido a una enfermedad genética. Un ejemplo es un gen que codifica la proteína CFTR.

Los vectores de SIV recombinantes pseudotipados de la presente invención se pueden purificar para hacerlos  
40 esencialmente puros. La frase "esencialmente puros" significa que los vectores lentivíricos pseudotipados esencialmente no contienen virus replicables distintos de lentivirus. La purificación se puede conseguir usando métodos de purificación y separación conocidos tales como filtración, centrifugación, y purificación en columna. Por ejemplo, un vector se puede precipitar y concentrar filtrando una solución del vector con un filtro de 0,45 µm, y a continuación centrifugarla a 42.500 g a 4 °C durante 90 minutos. Si es necesario, los vectores de SIV recombinantes  
45 pseudotipados de la presente invención se pueden preparar en forma de composiciones al combinarlos de forma adecuada con portadores o vehículos deseados farmacéuticamente aceptables. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que se puede administrar junto con el vector y no inhibe significativamente la transferencia génica mediada por el vector. Específicamente, el vector se puede combinar de forma conveniente con, por ejemplo, agua esterilizada, solución salina fisiológica, medio de cultivo, suero, tampón  
50 fosfato salino (PBS). El vector también se puede combinar con un estabilizante, biocida, y similar. Como reactivos o compuestos farmacéuticos son útiles composiciones que contienen un vector de SIV recombinante pseudotipado de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar composiciones de la presente invención como reactivos para la transferencia génica en citoblastos de las vías respiratorias, o como compuestos farmacéuticos para terapia génica de diversas enfermedades tales como enfermedades genéticas.

55 Un ácido nucleico transportado por un vector de SIV recombinante pseudotipado de la presente invención se puede introducir en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias mediante la puesta en contacto de este vector con células epiteliales de las vías respiratorias de primates, incluidos humanos. La presente divulgación se refiere a

métodos para la introducción de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias, que comprenden la etapa de puesta en contacto de las células epiteliales de las vías respiratorias con los vectores de la presente invención. La presente divulgación también se refiere a usos de vectores lentivíricos pseudotipados con proteínas espina de virus de ARN o ADN para la introducción de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias, con la  
 5 invención, tal como se reivindica, que se refiere al uso de vectores lentivíricos particulares pseudotipados con proteínas espina de virus de ARN como se describe en el presente documento. Los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias seleccionadas para la introducción de genes no está limitado en particular, y por ejemplo, como citoblastos epiteliales de las vías respiratorias también se pueden usar citoblastos derivados de médula ósea incluidos citoblastos mesenquimales que se pueden diferenciar en el epitelio deseado de las vías respiratorias de  
 10 simio o ser humano.

Los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias derivados de mono que se seleccionan para la transferencia de genes mediante los vectores lentivíricos pseudotipados de la presente invención no están limitadas en particular, y sus ejemplos incluyen citoblastos epiteliales de las vías respiratorias de tití, citoblastos epiteliales de las vías  
 15 respiratorias de mono rhesus, y citoblastos epiteliales de las vías respiratorias de macaco.

El procedimiento para la transferencia de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias usando un vector lentivírico pseudotipado de la presente invención se realiza mediante un método que comprende la etapa de puesta en contacto de las células epiteliales de las vías respiratorias con el vector. Por ejemplo, como se describe a  
 20 continuación en los ejemplos, el vector se puede poner en contacto con las células mediante su administración en la cavidad nasal usando un catéter.

Los vectores de SIV recombinantes pseudotipados de la presente invención tienen la ventaja de producir una eficiencia de transferencia génica extremadamente elevada incluso sin pretratamiento, tal como lavado de la  
 25 superficie celular antes de la puesta en contacto del vector.

La presente divulgación también se refiere a citoblastos epiteliales de las vías respiratorias introducidos con vectores lentivíricos de la presente invención pseudotipados con proteínas espina de virus de ARN o ADN, y células producidas mediante proliferación y/o diferenciación de estas células.  
 30

Los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias en las cuales se han introducido genes mediante el pseudotipado de vectores lentivíricos de la presente invención, y las células, tejidos, órganos y similares diferenciados de estos citoblastos de las vías respiratorias son útiles para evaluar y seleccionar los diversos tipos de agentes terapéuticos. Mediante la transferencia génica en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias, por ejemplo, se pueden evaluar o  
 35 se pueden seleccionar por sus efectos agentes terapéuticos o genes para realizar la diferenciación específica de tejidos o células, y en particular preferentemente tejidos o células derivadas de primates.

La presente divulgación también engloba citoblastos epiteliales de las vías respiratorias en los que se han introducido vectores lentivíricos pseudotipados de la presente invención, y células y tejidos diferenciados que se han  
 40 diferenciado de los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias. Las células y tejidos diferenciados se pueden identificar en base a su marcador de expresión y características morfológicas específicas de los tejidos o células.

Por otra parte, al usar los vectores de SIV recombinantes pseudotipados de la presente invención, los genes se  
 45 pueden introducir y expresar eficazmente en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias durante un periodo prolongado. Específicamente, la presente invención se refiere a agentes para la transferencia de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias, que comprenden como principio activo un vector lentivírico pseudotipado de la presente invención. Por ejemplo, cuando se usan los agentes de transferencia génica anteriormente mencionados para citoblastos epiteliales de las vías respiratorias, como tejido de producción se  
 50 pueden usar tejidos u órganos tales como los pulmones para proporcionar las proteínas necesarias para el tratamiento de la enfermedad.

Por otra parte, puesto que los vectores de SIV recombinante pseudotipados de la presente invención pueden introducir genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias durante periodos de tiempo prolongados como se  
 55 ha descrito anteriormente, se pueden aplicar a terapia génica de enfermedades respiratorias genéticas de primates incluidos seres humanos. Específicamente, la presente invención se refiere a agentes terapéuticos para enfermedades respiratorias genéticas que comprenden un vector vírico pseudotipado de la presente invención como principio activo.

La presente divulgación también se refiere a métodos para prevenir o tratar enfermedades respiratorias genéticas, que comprenden la etapa de administración de un vector de SIV recombinante pseudotipado de la presente invención a individuos (por ejemplo, pacientes). Los "individuos" en los métodos preventivos o terapéuticos de la presente invención preferentemente son, por ejemplo, primates incluidos seres humanos, pero pueden ser animales no humanos. En la presente divulgación, la "administración a individuos" se puede realizar, por ejemplo, mediante la puesta en contacto de un vector de SIV recombinante pseudotipado de la presente invención con células epiteliales de las vías respiratorias. Como se describe a continuación en los ejemplos, el contacto se puede conseguir mediante la administración del vector a la cavidad nasal usando un catéter.

- 10 Por otra parte, la presente invención se refiere a usos de vectores de SIV recombinantes pseudotipados de la presente invención para la producción de agentes terapéuticos para enfermedades respiratorias genéticas. Las enfermedades respiratorias genéticas seleccionadas no están limitadas en particular, pero un ejemplo preferido es la fibrosis quística.
- 15 Para el tratamiento de la enfermedad también se pueden utilizar células, tejidos, y órganos diferenciados de los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias en los que se han introducido genes. Por ejemplo, para enfermedades que se desarrollan debido a deficiencia o falta de un gen, se puede realizar el tratamiento que complementa la deficiencia del gen o la falta de enzimas sistémicas en circulación, factores de crecimiento, y similares, introduciendo el gen en un cromosoma de citoblastos de las vías respiratorias y trasplantando estas células en el cuerpo. Dichas enfermedades no están limitadas en particular. Por otra parte, en terapia génica relacionada con el trasplante de órganos, un antígeno histocompatible de un donador animal no humano se puede convertir en tipo humano. Por consiguiente, se pueden llevar a cabo aplicaciones que incrementen la tasa de éxito del xenotrasplante.

25 Cuando los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias en las que se ha introducido un gen usando un vector de SIV recombinante pseudotipado de esta invención proceden de mono, los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias se pueden trasplantar en monos modelo de enfermedad para proporcionar un sistema útil como modelo de tratamiento de la enfermedad humana. Se conocen muchos monos modelo de enfermedad para diversas enfermedades humanas. Por ejemplo, los monos modelo para la enfermedad de Parkinson humana se pueden producir de forma artificial; muchos monos diabéticos de forma natural se crían como modelos precisos de la diabetes humana; y la infección por SIV en monos se sabe que sirve como modelo preciso de la infección del VIH en humanos. Para estas enfermedades, es sumamente útil un sistema en el que se trasplantan citoblastos epiteliales de las vías respiratorias de simios en monos modelo de enfermedad como ensayo preclínico, antes de la aplicación clínica de los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias humanas.

### 35 Ejemplos

A continuación se describe específicamente la presente invención con referencia a los ejemplos, pero no se debe interpretar como limitada a los mismos.

#### 40 [Ejemplo 1] Construcción de plásmidos de expresión de proteínas de la cápsida del virus Sendai

##### (1) Construcción del plásmido de expresión de HN sustituido con el dominio citoplasmático

Se construyó un plásmido de expresión de HN, en el que se sustituyó el dominio citoplasmático de la proteína HN con el dominio citoplasmático de la proteína de la envoltura del SIV (Fig. 1). Después de hibridar tres grupos de oligonucleótidos sintéticos (Xho+Xma/Xma-XhoI, Xma+131/135-Xma, 132+Bam/Bam-136), se incorporaron a su vez al sitio XhoI-BamHI de pBluescript KS+. Se incorporaron un fragmento sintético purificado ligado al oligonucleótido obtenido por digestión del plásmido recombinante anteriormente mencionado con XhoI y DraIII y un fragmento purificado que comprende el lado 3' de la proteína HN obtenido mediante digestión del plásmido de expresión de la proteína HN, pCAGGS-HN, con DraIII y Bsu36I en el sitio XhoI-Bsu36I de pCAGGS (Gene, vol. 108, pp.193-200, 1991). El plásmido obtenido por el método anteriormente mencionado se utilizó como plásmido de expresión de HN sustituido con el dominio citoplasmático del SIV, pCAGGS-SIVct/HN.

##### (2) Construcción del plásmido de expresión de HN añadido al dominio citoplasmático del SIV

55 Se construyó un plásmido de expresión de HN, en el que el dominio citoplasmático de proteína de la envoltura del SIV se añadió a la proteína HN (Fig. 2). Se amplificó una región que contiene el dominio citoplasmático de la proteína de la envoltura del SIV y una porción de la proteína HN por PCR usando los cebadores FSIVhn y RhnSIV, y usando como molde el plásmido de expresión de la proteína HN sustituido con el dominio citoplasmático

mencionado anteriormente. Después de digerir el fragmento amplificado con XhoI y Accl, el fragmento se incorporó al sitio XhoI-Accl del pBluescript KS+ (Stratagene) preparado en (1) anterior, en el que se habían insertado los tres grupos de oligonucleótidos sintéticos, para reemplazar con el fragmento que contiene el dominio citoplasmático de la envoltura del SIV. Se incorporaron un fragmento sintético purificado ligado al oligonucleótido obtenido por digestión del plásmido recombinante anteriormente mencionado con XhoI y DraIII y un fragmento que comprende el lado 3' de la proteína HN obtenido mediante digestión del plásmido de expresión de la proteína HN, pCAGGS-HN, con DraIII y Bsu36I al sitio XhoI-Bsu36I de pCAGGS (Gene, vol. 108, pp.193-200, 1.991). El plásmido obtenido por el método anteriormente mencionado se utilizó como plásmido de expresión de HN añadido al dominio citoplasmático del SIV, pCAGGS-SIVct+HN.

10

(3) Construcción del plásmido de expresión de la proteína F con supresión del dominio citoplasmático

Se construyeron plásmidos de expresión de la proteína F, cada uno de los cuales contenía los primeros 27, 14, o 4 restos desde el extremo 5' de los aminoácidos del dominio citoplasmático de la proteína F y por lo tanto carecían de 15, 28, o 38 restos de aminoácidos, respectivamente (Fig. 3). Cada uno de los fragmentos que carecen de los 15, 28, y 38 aminoácidos, respectivamente, se amplificó por PCR utilizando pares de cebadores, XhFF y NotF1650, NotF1611 y NotF1581, y usando como molde el plásmido pBluescript KS+/Smal/F, en el que la región completa para la proteína F se había insertado en el sitio Smal de pBluescript KS+ (Stratagene). Los fragmentos amplificados se digirieron con XhoI y NotI, y a continuación cada uno se insertó en el sitio XhoI-NotI del plásmido que se había construido a partir de pCAGGS (Gene, vol.108, pp.193-200, 1991) mediante la inserción de un enlazador XhoI/NotI en el sitio EcoRI para construir plásmidos (supresión de 15 aminoácidos: pCAGGS-Fct27; delección de 28 aminoácidos: pCAGGS-Fct14; delección de 38 aminoácidos: pCAGGS-Fct4). Se usó pCAGGS-Fct4 como vector del SIV para el pseudotipado.

25 (4) Construcción del plásmido de expresión de la proteína F con supresión del dominio citoplasmático al que se añadió el dominio citoplasmático del SIV

Se construyeron plásmidos (Fig. 4) mediante la adición de los primeros 11 aminoácidos del extremo 5' del dominio citoplasmático del SIV (SIVct11) a plásmidos de expresión de la proteína F con supresión del dominio citoplasmático (los números de los aminoácidos en el dominio citoplasmático de la proteína F son los mismos que los de los plásmidos preparados en (3) anterior). Los fragmentos correspondientes a los tres tipos descritos anteriormente que carecen de los aminoácidos, pero que contienen el dominio citoplasmático del SIV añadido se amplificaron por PCR utilizando los pares de cebadores XhFF y SA-F1650, y SA-F1611 y SA-F1581, y utilizando como molde el plásmido pBluescript KS+/Smal/F, en el que se había insertado la región completa de la proteína F en el sitio Smal de pBluescript KS+ (Stratagene). Se digirieron los fragmentos amplificados con XhoI y NotI, y a continuación cada uno de ellos se insertó en el sitio XhoI-NotI del plásmido que se había construido a partir de pCAGGS (Gene, vol.108, pp.193-200, 1991) mediante la inserción de un enlazador XhoI/NotI en el sitio EcoRI para construir plásmidos (adición del SIVct11 + delección de 15 aminoácidos: pCAGGS-Fct27/SIVct11; adición del SIVct11 + delección de 28 aminoácidos: pCAGGS-Fct14/SIVct11; y adición del SIVct11 + delección de 38 aminoácidos: pCAGGS-Fct4/SIVct11).

40

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados en los ejemplos se enumeran a continuación.

FSIVhn: 5'-GAGACTCGAGATGTGGTCTGAGTTAAAAATCAGG-3' (SEQ ID NO: 9) RhnSIV:

**5'-AGAGGTAGACCAGTACGAGTCACGTTTGGCCCTATCACCATCCCTAACCCCTCTGTC  
CATAAAC-3' (SEQ ID NO: 10)**

XhFF: 5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3' (SEQ ID NO: 11)

NotF1650: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCATCTGATCTTCGGCTCTAATGT-3' (SEQ ID NO: 12)

NotF1611: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCAACGGTCATCTGGATTACCCAT-3' (SEQ ID NO: 13)

NotF1581: 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3' (SEQ ID NO: 14)

SA-F1650:

**5'-ATAGTTTAGCGGCCGCCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCCCTTCTGA  
TCTTCGGCTCTAATGT-3' (SEQ ID NO: 15)**

SA-F1611:

**5'-ATAGTTTAGCGGCCGCCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCCCTACGGT  
CATCTGGATTACCCAT-3' (SEQ ID NO: 16)**

SA-F1581:

**5'-ATAGTTTAGCGGCCGCCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCCCTCCTTC  
TGAGTCTATAAAGCAC-3' (SEQ ID NO: 17).**

Como resultado, aunque fue imposible el pseudotipado del SIV con proteínas de origen natural de la envoltura, la fusión del dominio citoplasmático (F) y la modificación mediante hemaglutinina-neuraminidasa (HN) permitió un pseudotipado eficiente. Se produjo un vector del SIV pseudotipado con SeVF/HN que contiene el gen de la GFP mediante transfección transitoria en células 293T, y esto se concentró por centrifugación usando técnicas utilizadas en general para vectores de pseudotipado de VSG-G.

[Ejemplo 2] Transferencia génica en células epiteliales de la cavidad nasal de ratón usando el vector del SIV pseudotipado con F/HN

Se administró un vector del SIV pseudotipado con F/HN que lleva eGFP usando un catéter delgado en la cavidad nasal de un ratón, fosa nasal izquierda, sin preacondicionamiento, (n = 3, 4 x 10<sup>8</sup> TU por animal; 100 µl). La duración de la expresión de los transgenes se produjo del día 3 al día 360, y se realizó un análisis anatómico de las secciones de la cavidad nasal de ratón según el método de Mery et al. (Mery et al. Toxicol. Pathol. Vol. 22, p. 353 -372, 1994). La expresión de la GFP se evaluó en secciones de la cavidad nasal ubicadas de 1 a 4 mm (secciones correspondiente a distancias de 1, 2, 3, y 4 mm) desde la punta del hueso nasal del ratón.

Como resultado, sin preacondicionamiento en las células epiteliales de las vías respiratorias, se observó una transfección eficiente y una expresión continua de la GFP durante al menos 160 días. Se comprobó que la expresión de eGFP se mantenía incluso el día 220 y el día 360. Puesto que el tiempo de supervivencia de las células epiteliales de la cavidad nasal del ratón es de 90 días o inferior (Borthwick et al. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. Vol. 24, pp. 662-670, 2001), estos resultados sugieren como evidencia indirecta que el gen ha sido introducido en citoblastos del tejido de las vías respiratorias de la cavidad nasal (Figs. 5 a 7).

Además, como se muestra en Fig. 8, los citoblastos permanecen en sus nichos cuando los citoblastos están presentes en nichos tales como la glándula submucosa (derecha) y cuando los citoblastos se encuentran dispersos alrededor de la membrana basal de las células epiteliales (izquierda), pero se sabe que las células diferenciadas se mueven (movimiento lateral) en los tejidos epiteliales para intercambiar lugares con células cuya vida ha concluido

(J.M.W.Slack Science Vol. 287, p.1431-1433, 2000). Por lo tanto, se encontraron células positivas para la GFP dispersas por toda la cavidad nasal incluso el día 160, el día 220, y el día 360. Si las células diferenciadas no se mueven, las células epiteliales diferenciadas se deben encontrar reunidas en torno a los citoblastos. Los resultados del experimento sugieren la posibilidad del movimiento lateral anteriormente mencionado.

5

Aplicabilidad Industrial

Los presentes inventores han proporcionado por primera vez vectores del virus de la inmunodeficiencia de simios recombinante pseudotipados con glicoproteínas F/HN de la envoltura del virus Sendai, un virus de ARN de la hebra no codificante, para la introducción de genes en citoblastos epiteliales de las vías respiratorias. Mediante el uso de estos vectores, se puede introducir un gen en los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias de manera eficiente durante mucho tiempo, y se considera que los vectores son muy valiosos para el tratamiento de enfermedades respiratorias genéticas tales como la fibrosis quística. Al mantener un gen exógeno en estado expresable en vectores de la presente invención, en el que el gen exógeno es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína disfuncional inherente o adquirida (tal como el factor que causa la fibrosis quística) o un gen que codifica una proteína que se ha vuelto disfuncional debido a una enfermedad genética, los vectores pueden llegar a ser muy útiles para el tratamiento de las enfermedades anteriormente mencionadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

20

<110> ID Pharma Co., Ltd.

<120> Transferencia génica en citoblastos del epitelio respiratorio usando vectores lentivíricos pseudotipados mediante proteínas espina de virus de ARN o virus de ADN

25

<130> P43379EP-D1-PCT

<150> JP 2005-313971

<151> 2005-10-28

30

<160> 17

<170> PatentIn version 3.3

35 <210> 1

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente

<400> 1

Trp Ser Glu Leu Lys Ile Arg Ser Asn Asp Gly Gly Glu Gly Pro Glu  
1 5 10 15

Asp Ala Asn Asp Pro Arg Gly Lys Gly Val Gln His Ile His Ile Gln  
20 25 30

Pro Ser Leu Pro Val Tyr Gly Gln Arg Val Arg Val Arg Trp Leu Leu  
35 40 45

Ile Leu Ser Phe Thr Gln  
50

45

<210> 2

<211> 54

<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

5 <223> secuencia sintetizada artificialmente

<400> 2

```

Trp Ser Glu Leu Lys Ile Arg Ser Asn Asp Gly Gly Glu Gly Pro Glu
1          5          10
Asp Ala Asn Asp Pro Arg Gly Lys Gly Val Gln His Ile His Ile Gln
20          25          30
Pro Ser Leu Pro Val Tyr Gly Gln Arg Val Arg Val Arg Asp Gly Asp
35          40          45
Arg Gly Lys Arg Asp Ser
50

```

10

<210> 3  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> secuencia sintetizada artificialmente

<400> 3

20

```

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg
1          5          10          15

```

<210> 4  
<211> 25

25 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente

30

<400> 4

```

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser
1          5          10          15
Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg
20          25

```

35 <210> 5  
<211> 38  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 726 176 T3

<400> 5

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr  
 20 25 30  
 Leu Glu Pro Lys Ile Arg  
 35

5 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia sintetizada artificialmente

<400> 6

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Arg  
 1 5 10 15  
 Val Arg Gln Gly Tyr Val Pro Leu Ser Pro  
 20 25

15  
 <210> 7  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia sintetizada artificialmente

25 <400> 7

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Arg Val Arg Gln Gly Tyr Val  
 20 25 30  
 Pro Leu Ser Pro  
 35

<210> 8  
 30 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 35 <223> secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 726 176 T3

<400> 8

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr  
 20 25 30  
 Leu Glu Pro Lys Ile Arg Arg Val Arg Gln Gly Tyr Val Pro Leu Ser  
 35 40 45  
 Pro

5 <210> 9  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

<400> 9

15 gagactcgag atgtggtctg agttaaaaat cagg 34

<210> 10  
 <211> 63  
 <212> ADN

20 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

25 <400> 10

agaggtagac cagtacgagt cacgtttgcc cctatcacca tccctaacc tctgtccata 60  
 aac 63

<210> 11  
 30 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 35 <223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

<400> 11

ccgctcgagc atgacagcat atatccagag a 31

40 <210> 12  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

<400> 12

atagtttagc ggccgctcat ctgatctcg gctctaagt 40

5 <210> 13  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

<400> 13

15 atagtttagc ggccgctcaa cggatcatcg gattacccat 40

<210> 14  
<211> 40  
20 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

25 <400> 14

atagtttagc ggccgctcac ctctgagtc tataaagcac 40

30 <210> 15  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

<400> 15

atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc cttctgatct 60

40 tcggctctaa tgt 73

<210> 16  
<211> 73  
<212> ADN  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

50 <400> 16

atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc ctacggatcat 60

ctggattacc cat 73

<210> 17

ES 2 726 176 T3

<211> 73  
<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> secuencia del cebador sintetizada artificialmente

<400> 17

```
          atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc ctccttctga      60
10      gtctataaag cac                                                                73
```

**REIVINDICACIONES**

1. Vector del SIV recombinante para su uso en el tratamiento de una enfermedad respiratoria genética mediante la introducción de un gen en un citoblasto epitelial de las vías respiratorias que no se ha sometido a pretratamiento o  
5 tratamiento de pre-acondicionamiento, en el que el vector (i) se somete a pseudotipado con proteínas espina de las glicoproteínas F y HN de la envoltura del virus Sendai, y (ii) comprende un gen exógeno en estado expresable, y además en el que dicho vector permite la integración de dicho gen exógeno en dicho citoblasto para así proporcionar una expresión de genes exógenos a largo plazo durante al menos 160 días;  
en el que el gen exógeno es:
- 10 (a) un gen que codifica una proteína disfuncional inherente o adquirida;  
(b) un gen que complementa un gen deficiente en una enfermedad respiratoria genética; o  
(c) un gen que codifica una proteína que es necesaria para el tratamiento de una enfermedad respiratoria genética.
2. Uso de un vector del SIV recombinante en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una  
15 enfermedad respiratoria genética, en el que:
- (a) dicho vector se somete a pseudotipado con proteínas espina de las glicoproteínas F y HN de la envoltura del virus Sendai y comprende un gen exógeno en un estado expresable y en el que dicho vector permite la integración de dicho gen exógeno en un citoblasto epitelial de las vías respiratorias para así proporcionar una expresión de genes exógenos a largo plazo durante al menos 160 días; y
- 20 (b) dicho medicamento es para su administración a los citoblastos epiteliales de las vías respiratorias;  
en el que el gen exógeno es:
- (i) un gen que codifica una proteína disfuncional inherente o adquirida;  
(ii) un gen que complementa un gen deficiente en una enfermedad respiratoria genética; o  
(iii) un gen que codifica una proteína que es necesaria para el tratamiento de una enfermedad respiratoria genética.
- 25 3. Vector para uso de la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, en el que la enfermedad respiratoria genética es la fibrosis quística.
4. Vector para uso de la reivindicación 1 ó 3, o el uso de la reivindicación 2 o 3, en el que el vector del SIV  
30 recombinante deriva de una cepa agm.
5. Vector para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el vector del SIV recombinante es un vector auto-inactivante en el que la secuencia promotora para la región U3 de LTR 3' se elimina y/o sustituye por otra secuencia promotora.
- 35 6. Vector para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, o el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el gen exógeno es un gen que codifica:
- (a) un factor causante de la fibrosis quística (FQ) disfuncional inherente o adquirida;  
(b) una proteína CFTR disfuncional inherente o adquirida;
- 40 (c) una proteína que tiene un efecto terapéutico sobre la fibrosis quística;  
(d) una proteína CFTR que es necesaria para el tratamiento de la fibrosis quística; o  
(e) una proteína CFTR, en la que la expresión de dicha proteína CFTR complementa un gen de CFTR deficiente.
7. Vector para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o el uso según cualquiera de las  
45 reivindicaciones 2 a 6, en el que el gen exógeno se expresa en el citoblasto epitelial de las vías respiratorias durante al menos 220 días, o al menos 360 días.
8. Vector para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7, o el uso según cualquiera de las  
reivindicaciones 2 a 7, en el que el vector del SIV recombinante es para la administración nasal.
- 50

# FIG. 1

SIVct/HN WSELKIRSNDGGEGPEDANDPRGKGVQHIHIQPSLPVYGQVRVR WLLILSFTQ

(SEQ ID NO: 1)

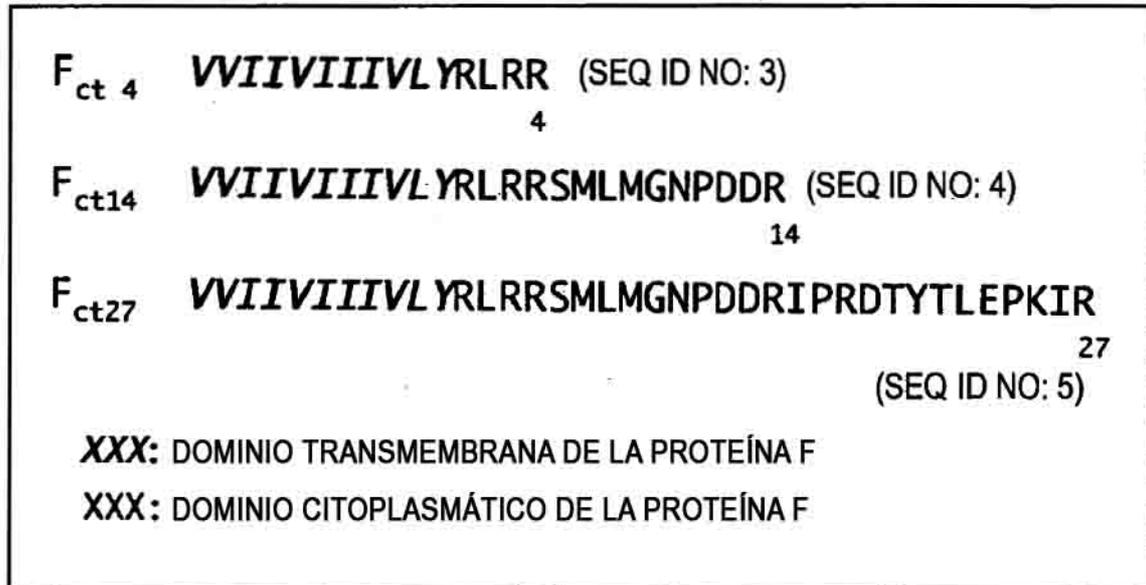
xxx: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DEL SIV    xxx: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE LA PROTEÍNA HN

## FIG. 2

SIVct+HN WSELKIRSNDGGEGPEDANDPRGKGVQHIHIQPSLPVYGQVRVR DGDRGKRDS  
(SEQ ID NO: 2)

xxx: DOMINIO CITOPLASMÁTICO DEL SIV    xxx: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE LA PROTEÍNA HN

# FIG. 3



## FIG. 4

$F_{ct\ 4}/SIV_{ct11}$	<i>WIIIVIIIVLYRLRR</i>	<u><i>RVRQGYVPLSP</i></u>	(SEQ ID NO: 6)
$F_{ct14}/SIV_{ct11}$	<i>WIIIVIIIVLYLRRSMLMGNPDDR</i>	<u><i>RVRQGYVPLSP</i></u>	(SEQ ID NO: 7)
$F_{ct27}/SIV_{ct11}$	<i>WIIIVIIIVLYLRRSMLMGNPDDRIPRDTYTLPEKIR</i>	<u><i>RVRQGYVPLSP</i></u>	(SEQ ID NO: 8)

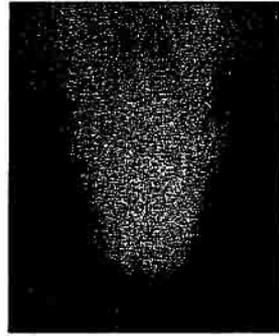
xxx: DOMINIO TRANSMEMBRANA DE LA PROTEÍNA F

xxx: DOMINIO CITOPASMÁTICO DE LA PROTEÍNA F

xxx: 11 AMINOÁCIDOS DEL DOMINIO CITOPASMÁTICO DEL SIV

FIG. 5

CAVIDAD NASAL DE RATÓN



Día 36 (3/3)



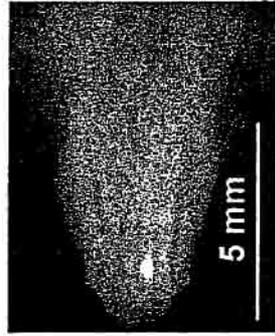
Día 20 (3/3)



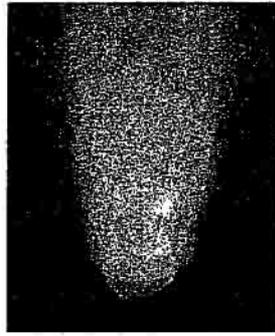
Día 10 (3/3)



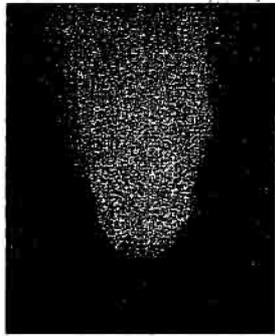
Día 3 (3/3)



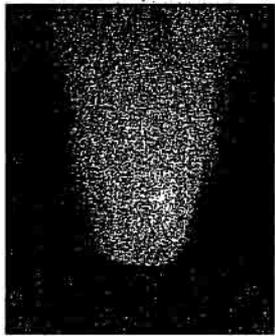
5 mm  
Día 220 (1/1)



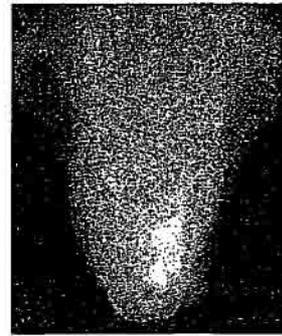
Día 160 (1/3)



Día 90 (1/3)



Día 50 (3/3)



Día 360 (1/1)

FIG. 6

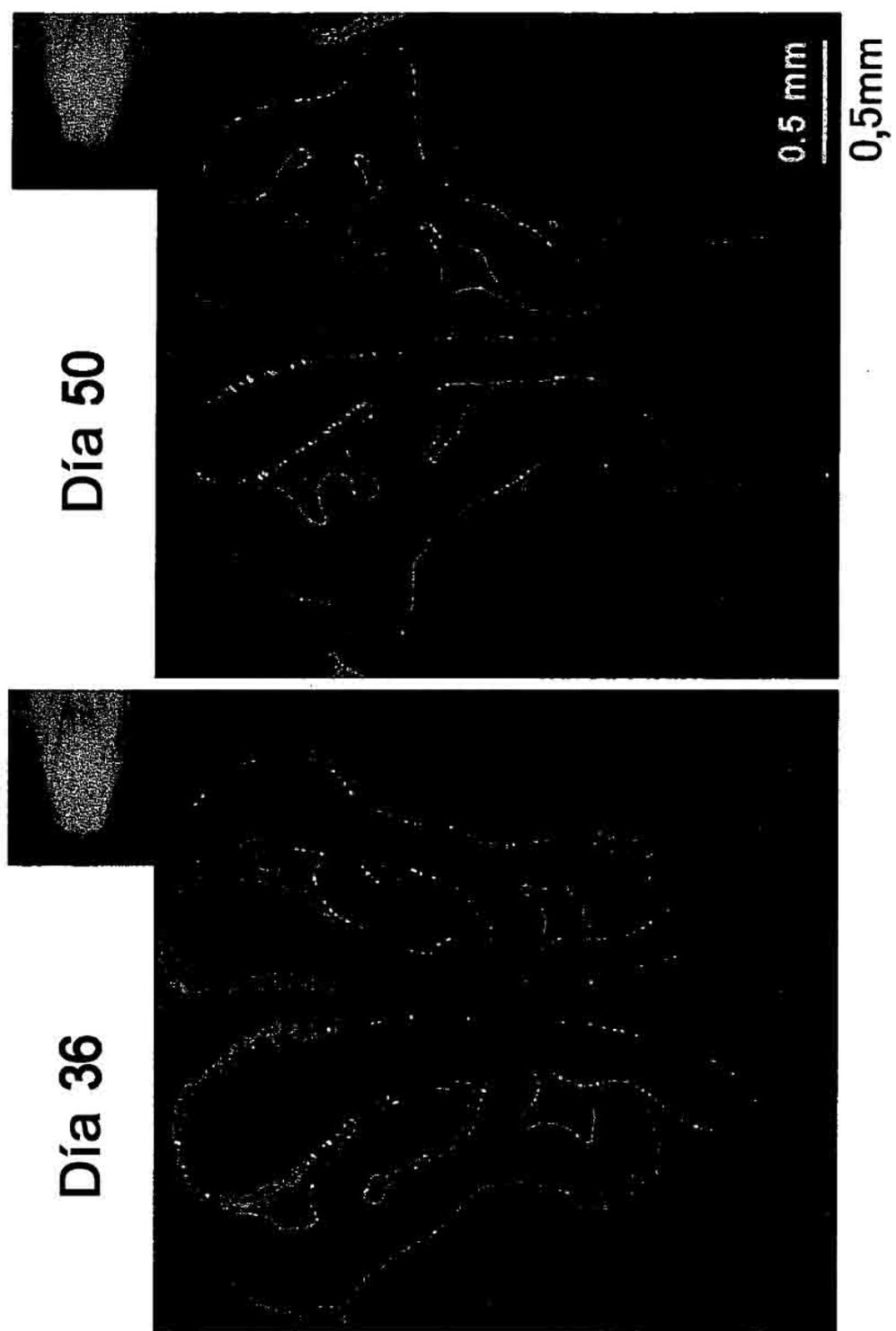


FIG. 7

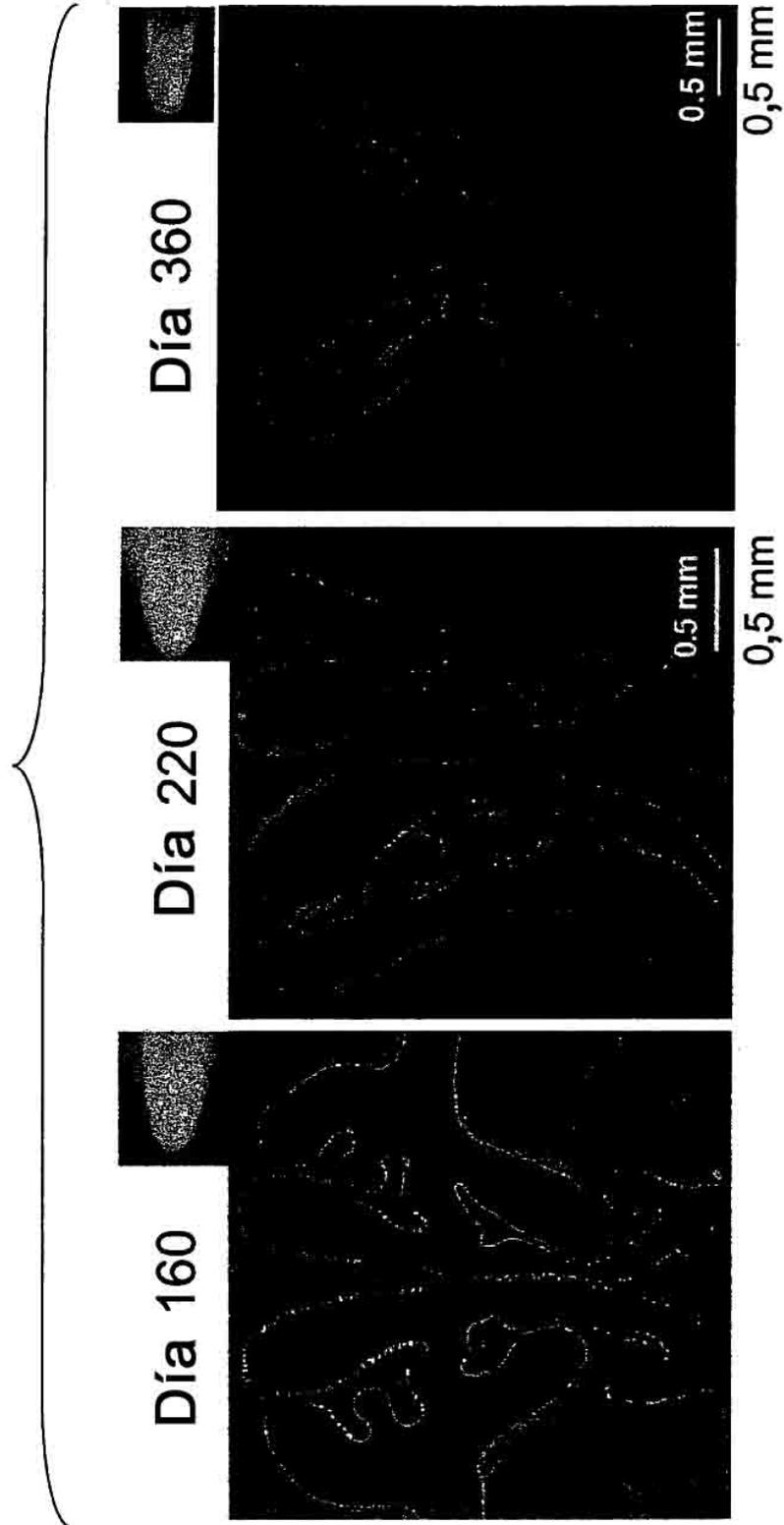


FIG. 8

