

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 523**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 47/64 (2007.01)

A61K 47/69 (2007.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2003 PCT/US2003/031598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.04.2004 WO04033639**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2003 E 03774576 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 1549339**

54 Título: **Dirección del virus del herpes simple a receptores específicos**

30 Prioridad:

07.10.2002 US 416716 P

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

11.02.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)
5640 South Ellis Avenue, Suite 405
Chicago, IL 60637, US**

72 Inventor/es:

**ROIZMAN, BERNARD;
ZHOU, GOUYING y
YE, GUO, JIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 741 523 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

Dirección del virus del herpes simple a receptores específicos

5 Intereses gubernamentales

El gobierno de EE.UU. posee derechos sobre la invención de conformidad con el número de concesión del Instituto Nacional del Cáncer 1PO1 CA71933.

10 Antecedentes de la invención

El ritmo constante de los avances en materia de atención sanitaria ha conducido a una mejora continua en la salud y la calidad de vida de los seres humanos y de los animales. Sin embargo, una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones han eludido en gran medida los mejores esfuerzos en prevención o tratamiento. La principal de estas enfermedades es la pérdida del control del ciclo celular que, con frecuencia, genera la proliferación celular no deseada característica del cáncer en sus muchas formas, tales como el glioma maligno. Los gliomas malignos son tumores cerebrales devastadores que afectan a animales tales como los seres humanos. El período medio de vida tras el diagnóstico es inferior a un año, y se ha informado que pocos pacientes sobreviven cinco años. Asimismo, ninguna de las terapias convencionales contra el cáncer ha tenido éxito en prolongar significativamente el período de vida de los pacientes con esta enfermedad. En los últimos años, ha habido numerosos intentos de usar virus del herpes simple (VHS) modificados genéticamente como agentes oncolíticos para tratar los gliomas malignos. Debido a que los virus de tipo silvestre son altamente virulentos, los virus usados en las evaluaciones preclínicas y en los estudios clínicos de fase 1 se han atenuado por completo. Si bien se han probado varios mutantes de eliminación, los mutantes que alcanzaron ensayos clínicos carecían del gen $\gamma_{134.5}$ que codifica la proteína celular infectada 34.5 (ICP34.5) y, opcionalmente, del gen $UL39$ que codifica la gran subunidad de ribonucleótido reductasa.

Estos virus VHS atenuados, sin embargo, no se han diseñado por ingeniería genética sin imperfecciones como agentes oncolíticos. Una ventaja de estos virus mutantes es que tienen una capacidad significativamente reducida para replicarse en células normales que no se dividen *in vivo*. La ribonucleótido reductasa vírica es un gen esencial para la replicación vírica en células en reposo y, por tanto, el virus mutante $UL39$ es disfuncional en el entorno normal del sistema nervioso central (Simard *et al.* 1995). La función principal de ICP34.5 es impedir el cierre de la síntesis de proteínas causada por la activación de la proteína quinasa R en las células infectadas. Una vez activada, esta enzima fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción 2 (eIF2 α), lo que resulta en el cese total de la traducción. Los mutantes que carecen de los genes $\gamma_{134.5}$ están altamente atenuados, porque el ciclo de vida lítico está completamente bloqueado en un fondo celular interferón+. Por el contrario, los mutantes $\gamma_{134.5}$ son casi tan virulentos como el virus de tipo silvestre en ratones que carecen de receptor de interferón. Aunque los mutantes con eliminación tanto de $\gamma_{134.5}$ como de $UL39$ no están significativamente más atenuados que los que carecen de los genes $\gamma_{134.5}$, dichos mutantes proporcionan un seguro adicional en forma de un riesgo reducido de reversión.

Una desventaja significativa de estos virus VHS mutantes es su baja replicación, incluso en células en división. En sistemas animales experimentales, los virus mutantes no presentan ciclos de vida líticos sostenidos, con la pérdida de una respuesta potencialmente amplificada a una dosis terapéutica dada del virus que se esperaría en la reinfección de células tumorales por la progenie vírica multiplicada. Por consiguiente, la destrucción máxima de las células tumorales requiere altas dosis de virus. Dado el bajo crecimiento de estos virus VHS mutantes, incluso en células en división, la producción de grupos de virus lo suficientemente grandes como para producir inóculos eficaces de $> 10^9$ unidades formadoras de placa (UFP) ha seguido siendo un obstáculo importante. Además, la unión indiscriminada del virus a las células no tumorales disminuye aún más la efectividad de las dosis del virus VHS, porque las partículas víricas mal dirigidas no contribuyen al efecto terapéutico beneficioso deseado de la destrucción de las células tumorales. Un enfoque para superar estos obstáculos es lograr una comprensión más exhaustiva del ciclo de vida lítico del VHS y, por tanto, facilitar el desarrollo de mutantes del VHS diseñados para su uso como agentes terapéuticos con diana específica, tales como agentes oncolíticos con diana específica.

El VHS entra en las células hospedadoras usando un mecanismo de dos etapas. La primera etapa de entrada es la unión del VHS a la superficie celular. Esta etapa es iniciada por las glicoproteínas B y C (gB y gC), que se proyectan desde la envoltura vírica, uniéndose a los proteoglicanos de sulfato de heparán en las superficies de las células hospedadoras. Los dominios gB y gC que interactúan con el sulfato de heparán se han cartografiado a nivel de secuencia (Laquerre *et al.* 1998). Tras esta unión inicial, la glicoproteína D (gD) vírica interactúa con uno de varios receptores. De estos receptores de gD, dos son particularmente importantes para la entrada (Spear *et al.*, 2000). Un receptor, designado HveA, es miembro de la familia de receptores de proteínas de necrosis tumoral. Un segundo receptor, designado HveC, es miembro de la familia de las proteínas nectina, relacionadas estructuralmente con la superfamilia de las inmunoglobulinas, que sirven como conectores intercelulares (Campadelli-Fiume *et al.* 2000). La segunda etapa de la entrada del VHS en una célula es la fusión de la envoltura vírica con la membrana plasmática de la célula. Para efectuar la fusión, gD, cuando está unida a su receptor, recluta glicoproteínas B, H y L, lo que produce la fusión de la envoltura con la membrana plasmática.

La comprensión adicional de la infección por VHS proviene de estudios recientes que han dado importancia a una

antigua observación de que la gD interactúa con el receptor de fosfato de manosa 6 independiente de los cationes, contribuyendo a la acumulación del VHS en los endosomas. La endocitosis de partículas víricas produce la degradación de las partículas por parte de las enzimas lisosomales, pero las células sucumben como consecuencia de la degradación del ADN celular por parte de la ADNasa liposomal. La gD del VHS bloquea esta vía apoptótica hacia la muerte celular a través de su interacción con el receptor de fosfato de manosa 6. Por lo tanto, la gD interactúa con HveA, nectinas, el receptor de fosfato de manosa 6 y al menos uno de los complejos de glicoproteínas víricas que participan en la fusión del VHS con la membrana plasmática.

En un intento de dirigir la infección por VHS-1 a células específicas, se construyó un VHS recombinante que tenía una proteína quimérica que comprendía gC y eritropoyetina (EPO) en su superficie. Aunque se produjo el virus recombinante unido a las células que expresaban el receptor EPO y se produjo la endocitosis del virus, no se produjo una infección exitosa de estas células que expresaban el receptor EPO.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de agentes terapéuticos víricos que presenten capacidades de dirección mejoradas, a la vez que conserven la capacidad de infección suficiente para ser terapéuticamente útiles. Idealmente, los virus adecuados serían agentes terapéuticos, tales como agentes oncolíticos, por sí mismos, así como proporcionando un vehículo o vector de dirección para la administración controlada de regiones codificantes de polinucleótidos útiles como agentes terapéuticos. También se necesitan en la técnica agentes con diana específica útiles en aplicaciones de diagnóstico como, por ejemplo, agentes de generación de imágenes o vehículos con diana específica para agentes de generación de imágenes.

Sumario

La invención satisface la necesidad mencionada anteriormente en la técnica al proporcionar formas víricas adecuadas para su uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico en sí mismos, además de proporcionar un vehículo listo para la administración de regiones codificantes de polinucleótidos terapéuticos o de diagnóstico a las células. Estas formas víricas son virus modificados de la familia de virus *Herpesviridae*, y se derivan preferentemente del virus del herpes simple de tipo 1 o tipo 2. La invención proporciona un método para fabricar partículas de virus con un nuevo ligando, y hacer que dichas partículas dependan totalmente de un receptor de dicho ligando para entrar en las células diana.

Específicamente, la presente invención proporciona una partícula de virus del herpes simple (VHS) recombinante que tiene en su superficie:

(a) una proteína de la superficie vírica de VHS alterada que comprende una gB mutagenizada o una gC mutagenizada que impida la interacción con el sulfato de heparán, en la que la alteración reduce la unión de la proteína de la superficie vírica de VHS a un proteoglicano sulfatado, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al proteoglicano sulfatado de la proteína de superficie que no tiene la alteración;

(b) una gD alterada, en la que la alteración es una inserción de un ligando peptídico IL13 heterólogo que interrumpe el sitio de unión de gD para el HveA, reduciendo así la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares en comparación con una gD que no tiene la alteración; en la que el ligando peptídico heterólogo está en la superficie de la partícula de VHS recombinante y es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular, y en la que dicho ligando peptídico heterólogo está en forma de una proteína de fusión con dicha gD alterada,

en la que el ligando peptídico heterólogo es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular. Además, la presente invención proporciona un VHS recombinante que comprende:

(a) un primer gen que codifica una proteína de superficie vírica de VHS alterada que comprende una gB mutagenizada o una gC mutagenizada que impide la interacción con el sulfato de heparán, en la que la alteración reduce la unión de la proteína de la superficie vírica de VHS a un proteoglicano sulfatado, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al proteoglicano sulfatado de la proteína de superficie que no tiene la alteración; y

(b) un segundo gen que codifica una gD alterada, en la que la alteración es una inserción de un ligando peptídico IL13 heterólogo que interrumpe el sitio de unión de gD para el HveA, reduciendo así la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares en comparación con una gD que no tiene la alteración, en el que la región de codificación del segundo gen que tiene la región de codificación para el ligando superficial peptídico heterólogo

insertada conjuntamente en el mismo codifican una proteína de fusión que comprende la gD alterada y el ligando superficial peptídico heterólogo, y

en la que el ligando peptídico heterólogo es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular. Además, la presente invención proporciona una partícula de VHS recombinante que comprende un ligando peptídico específico de un receptor de superficie celular,

en la que el ligando peptídico está en forma de una proteína de fusión con una gD alterada, en la que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración, y

en la que el ligando peptídico es IL13 y/o

en la que la gD se altera mediante la inserción del ligando peptídico en el aminoácido 24,

para su uso en un método para dirigir dicha partícula de VHS recombinante a dicha célula para el tratamiento de una enfermedad tumorigénica. Además, la presente invención proporciona un método de obtención de imágenes de una célula que comprende:

- 5 (a) poner en contacto la célula con una partícula de VHS recombinante que comprende:
- (i) una gD alterada que comprende la inserción del ligando peptídico IL13 en gD interrumpiendo así el sitio de unión de gD para el HveA, en la que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares, en la que dicha gD alterada está en forma de una fusión con el ligando peptídico con un receptor específico de la célula; y
- 10 (ii) un gen que codifica una proteína marcadora; y

(b) detectar la presencia de la proteína marcadora,

15 en la que la unión es reducida en comparación con la unión al uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración. Además, la presente invención proporciona una partícula de VHS recombinante para su uso en un método para matar una célula diana, en el que dicha partícula de VHS comprende una gD alterada que comprende la inserción del ligando peptídico IL13 en gD, interrumpiendo así el sitio de unión de gD para el HveA, en la que la gD alterada se fusiona con el ligando peptídico IL13 a un receptor específico para dicha célula,

20 en la que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración, y en el que dicha célula diana se pone en contacto con dicha partícula de VHS recombinante.

Además, la presente invención proporciona un método para matar una célula diana *in vitro*, que comprende poner en contacto la célula diana con una partícula de VHS recombinante,

25 en el que la partícula de VHS comprende una gD alterada que comprende la inserción del ligando peptídico IL13 en gD, interrumpiendo así el sitio de unión de gD para el HveA, en el que la gD alterada se fusiona con el ligando peptídico IL13 a un receptor específico para la célula, en el que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares, y en el que la unión es reducida en comparación con la unión a uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración. En el presente documento, se desvelan métodos para modificar la superficie de, por ejemplo,

30 una partícula de virus VHS de una manera que se dirige el virus a un receptor específico presente en la superficie de una célula de elección, normalmente, una célula que necesita terapia o una célula cuya presencia proporciona información de valor diagnóstico. La invención proporciona partículas víricas de VHS, que tienen una afinidad reducida por su/s receptor/es natural/es de la superficie celular, y métodos para producir y usar dichas partículas, lo que reduce al mínimo o elimina el problema de la eficiencia reducida asociada con la dirección errónea de los virus terapéuticos y de diagnóstico. Además, la invención proporciona partículas víricas de VHS, que presentan afinidad específica por un componente de la superficie celular que no es un receptor vírico natural y que está presente única o predominantemente en una célula diana determinada, así como métodos de producción y uso de dichos virus. Las partículas víricas modificadas (por ejemplo, de VHS) que tienen mayor afinidad por un componente de la superficie celular asociado con una o más células diana presentan capacidades de dirección mejoradas en relación con las partículas víricas de la técnica anterior. Las partículas de VHS modificadas tienen una unión indiscriminada reducida, reduciendo así al mínimo el secuestro de las dosis víricas lejos de las células diana. La invención proporciona además partículas de VHS modificadas, que tienen una afinidad reducida por los receptores víricos naturales y una afinidad aumentada por un componente de la superficie celular asociado con una célula o células diana particulares, partícula vírica modificada que recluta eficazmente ese componente de la superficie celular para su uso como receptor vírico.

35 En el presente documento, se describen otros beneficios de los virus modificados, y serán evidentes para los expertos en la materia tras la revisión de la presente divulgación.

40 En un aspecto, la invención proporciona un VHS recombinante que comprende una proteína de la superficie del virus alterada para reducir la unión a un proteoglicano sulfatado y una gD alterada tanto para reducir la unión a uno o más de sus receptores celulares como para incorporar un ligando peptídico heterólogo, gD o una de sus partes, mantiene sus propiedades de fusión de membrana, pero tiene una capacidad reducida para unirse a HveA.

45 Se desvela un método para dirigir una partícula de VHS a una célula que expresa un receptor de superficie celular particular. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, tal como una célula de un glioma maligno, y el receptor de superficie celular es IL13R α 2. En dichas realizaciones, se prefiere que el VHS comprenda una proteína de fusión gD/IL-13 en su superficie.

50 Se desvela un método para obtener imágenes de una célula que comprende (a) poner en contacto la célula con una partícula de VHS recombinante que comprende (i) una gD alterada que forma una fusión con un ligando peptídico a un receptor específico de la célula y (ii) un gen que codifica una proteína marcadora y (b) detectar la presencia de la proteína marcadora.

55 Se desvela un método para matar una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con una partícula de VHS recombinante que comprende una gD alterada que forma una fusión con un ligando peptídico a un receptor específico de la célula.

60 Se desvela un método para matar una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con una partícula de VHS recombinante que comprende una gD alterada que forma una fusión con un ligando peptídico a un receptor específico de la célula.

65 Se desvela un método para matar una célula diana, que comprende poner en contacto la célula diana con una partícula de VHS recombinante que comprende una gD alterada que forma una fusión con un ligando peptídico a un receptor específico de la célula.

Se desvela un VHS recombinante que comprende (a) un primer gen que codifica una proteína de superficie vírica alterada, en la que la alteración reduce la unión de la proteína de la superficie vírica a un proteoglicano sulfatado; (b) un segundo gen que codifica una gD alterada, en el que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares; y (c) una región de codificación para un ligando superficial peptídico heterólogo, en el que la región de codificación del segundo gen y la región de codificación para un ligando superficial peptídico heterólogo codifican conjuntamente una proteína de fusión que comprende la gD alterada y el ligando superficial peptídico heterólogo.

Otras características y ventajas de la invención se entenderán mejor con referencia a la breve descripción de los dibujos y a la descripción de las realizaciones ilustrativas que figuran a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Representación esquemática del genoma de VHS-1 (F) y manipulaciones génicas en la glicoproteína C (gC), glicoproteína B (gB) y glicoproteína D (gD). Carril 1, disposición de la secuencia del genoma de VHS-1. Los recuadros rectangulares representan las secuencias de repetición invertidas ab y b'a' que flanquean la secuencia larga única (U_L), y la repetición invertida c'a' y ca que flanquean la secuencia corta única (U_S). Carril 2, disposición de la secuencia de dominios de la glicoproteína C; se destacan el dominio de péptido señal (SP) y el dominio de unión a sulfato de heparán (HS) de gC. Carril 3, IL13 humano con péptido señal que reemplazó el segmento N-terminal de 148 aminoácidos de gC. Carril 4, disposición de la secuencia del dominio de polilisina de gB. Carril 5, representación esquemática de un genoma de VHS-1 recombinante (F), en el que se reemplazó el dominio N-terminal de gC por IL13 y se eliminó el dominio de polilisina (del codón 68 al codón 77) de gB. Carril 6, disposición de la secuencia de la glicoproteína J (gJ), glicoproteína D (gD) y glicoproteína I (gI) en U_S. Carril 7, reemplazo de gD por el promotor temprano inmediato de CMV para permitir la expresión de gI. Carril 8, representación esquemática del genoma de VHS-1 (F) recombinante, en el que el dominio N-terminal de gC fue reemplazado por IL13, se eliminó el dominio de polilisina de gB y se insertó IL13 después del aminoácido 24 de gD. Carril 9, se insertó un polienlazador XhoI-BglII-EcoRI-KpnI después del aminoácido 24 de gD, con IL13 insertado en los sitios XhoI y KpnI de gD.

Fig. 2. Alineación de secuencia de aminoácidos de IL13-gC, secuencia de unión de IL13-gD y el dominio de unión a HS de gB. Fig. 2A. La secuencia amino-terminal de la proteína quimérica IL13-gC (SEQ ID NO: 22). Se muestran las secuencias dirección 5' y dirección 3' de la parte del sitio de unión a HS. Se insertó IL13 entre los dos sitios de enzimas de restricción que están subrayados. Fig. 2B. El dominio del marco abierto de lectura de gB (es decir, ORF) del que se eliminó la secuencia de polilisina [poli (K)] (SEQ ID NO: 23). Las secuencias subrayadas (codones 68-77) no estaban presentes en gB amplificada de R5107. Fig. 2C. La secuencia amino-terminal de IL13-gD (SEQ ID NO: 24). La primera secuencia subrayada identifica el péptido señal de gD. Se insertó IL13 (entre corchetes con flechas) entre los restos 24 y 25 (subrayados) de gD, entre los sitios de enzimas de restricción XhoI y KpnI.

Fig. 3. Verificación del ADN vírico de R5111 mediante PCR. Fotografías de productos de PCR separados electroforéticamente amplificados directamente de las placas recogidas de células Vero (Fig. 3A) y HEp-2 (Fig. 3B). Los ADN víricos se extrajeron como se describe en el Ejemplo 1 y se sometieron a PCR con cebadores de "IL13" del ORF de IL13 y de cebadores de IL13-gD, con IL13 y el ectodominio de gD entre paréntesis.

Fig. 4. Fotografía de proteínas separadas electroforéticamente de lisados de células infectadas con R5111 reaccionadas con anticuerpos contra gC, gD o IL13. Se expusieron células HEp-2 cultivadas en matraces de 25 cm² a 10 UFP de VHS-1 o R5111 por célula. Las células se cosecharon 24 horas después de la infección, se solubilizaron, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes al 10 %, se transfirieron eléctricamente a una lámina de nitrocelulosa y se expusieron a un anticuerpo monoclonal contra gD (Fig. 4A), gC (Fig.4B) o IL13 (Fig. 4C), respectivamente. Se indican las bandas de proteína correspondientes a la gC, la proteína de fusión IL13-gC, gD y la proteína de fusión IL13-gD. IL13-gC tenía el mismo tamaño que la gC nativa, como cabía esperar.

Fig. 5. Expresión de IL13Rα2 marcado con HA a partir de clones individuales de transfectantes estables de la estirpe celular J1.1. Se amplificaron clones individuales como se describe en el Ejemplo 1. Se cosecharon células de matraces de 25 cm², se solubilizaron y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizantes al 12 %, se transfirieron eléctricamente a una lámina de nitrocelulosa y se expusieron a un anticuerpo policlonal contra el marcador HA.

Fig. 6. Diagrama del vector pgD-.

Descripción de realizaciones ilustrativas

La invención proporciona beneficios que mejorarán la salud y el bienestar de animales tales como el ser humano al proporcionar un enfoque específico para el tratamiento de una variedad de afecciones y enfermedades que actualmente afectan a la salud, generando importantes cargas económicas cuando se usan los tratamientos convencionales. Al proporcionar partículas víricas modificadas que tienen capacidades de dirección controlables, se

puede administrar con mayor precisión el beneficio diagnóstico y terapéutico de los propios virus a células particulares. Además, estas partículas víricas se pueden usar como vehículos de dirección para la administración de una amplia variedad de biomoléculas terapéuticas y de diagnóstico, tales como polinucleótidos que codifican péptidos terapéuticos o de diagnóstico.

Más allá de las partículas víricas modificadas, la invención proporciona métodos para fabricar dichos agentes terapéuticos y de diagnóstico, así como métodos para usar los agentes para diagnosticar o tratar una variedad de enfermedades y afecciones, tales como enfermedades tumorigénicas (por ejemplo, gliomas). Para facilitar la comprensión de la invención y todos sus aspectos, a continuación, se describen realizaciones ilustrativas. Las descripciones de estas realizaciones ilustrativas no pretenden limitar la invención a las realizaciones desveladas en el presente documento. A la luz de la descripción, un experto en la materia comprenderá que se pueden realizar muchos cambios y modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que sigan permaneciendo dentro de la invención. Las realizaciones ilustrativas se desvelan usando como virus ilustrativo un miembro de la familia de virus *Herpesviridae*, virus del herpes simple o VHS.

Como se ha señalado anteriormente, el VHS-1 y el VHS-2 son miembros de la familia de virus conocidos como *Herpesviridae*, cuyas estructuras son bien conocidas en la técnica. Los métodos de selección son aplicables a cualquier miembro de *Herpesviridae*, y no se limitan a las realizaciones ilustrativas descritas en los ejemplos. Asimismo, se conoce un gran número de virus VHS recombinantes en la técnica. Dichos virus pueden contener uno o más genes heterólogos. Asimismo, dichos virus pueden contener uno o más genes de VHS mutados, por ejemplo, mutaciones que hacen que el virus se replique de manera deficiente o que afecten a la virulencia del virus en uno o más tipos de células.

Los ejemplos de VHS recombinante que contiene un gen heterólogo y los métodos para fabricar y usar dichos virus se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.599.691. Los genes heterólogos preferidos incluyen genes que codifican proteínas marcadoras. Las proteínas marcadoras, tales como la proteína verde fluorescente, la luciferasa y la beta-galactosidasa, permiten la detección de células que expresan la proteína. En otras realizaciones, el gen heterólogo codifica una enzima que activa un profármaco, matando así a las células adyacentes no infectadas. En otras realizaciones más, el gen heterólogo codifica una proteína que afecta a la respuesta inmunitaria, tal como la interleucina 12 (IL-12). Dichas proteínas que activan la respuesta inmunitaria contra un tumor son particularmente útiles.

En un aspecto, la invención se refiere a la modificación de la superficie de una partícula de VHS para dirigir el virus a un receptor específico. Al crear una proteína de fusión que comprende una parte de gD y un ligando, el virus se dirige a una célula que tiene un receptor de superficie celular que se une al ligando. De acuerdo con la invención, las proteínas superficiales de VHS, gB o gC y gD, se alteran para reducir la unión a los receptores naturales del VHS.

Un "receptor natural", como se usa en el presente documento, es una molécula de superficie celular que interactúa con el VHS de tipo silvestre en ausencia de intervención humana. Por ejemplo, gB y gC de VHS-1 interactúan con proteoglicanos de sulfato de heparán en una infección natural. En realizaciones preferidas, gB y/o gC se alteran para reducir o eliminar la unión a los proteoglicanos de sulfato de heparán. Como otro ejemplo, se sabe que gD se une a varios receptores, incluyendo HveA y HveC, en una infección natural. En realizaciones preferidas, gD se altera para reducir o eliminar la unión a HveA y/o HveC.

Receptores-ligandos

Como se usan en el presente documento, "receptor" y "ligando" se refieren a dos miembros de un par de unión específico y, por tanto, son parejas de unión. Un receptor es ese miembro del par que se encuentra localizado en la superficie de la célula; el ligando es el miembro del par que se encuentra en la superficie del VHS. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el "ligando" puede ser realmente lo que la técnica reconoce como un receptor fuera del contexto de la invención y el "receptor" puede ser su respectivo ligando. Además, un "ligando" y un "receptor", como se usan en el presente documento, se refieren a moléculas intactas o partes de dichas moléculas que conservan la capacidad de unirse específicamente al otro miembro del par de unión.

Una ventaja de la invención es la capacidad de adaptar el VHS para dirigirse a un receptor específico mientras se mantiene la infectividad del virus. En una realización ilustrativa, una partícula de VHS contiene una proteína de fusión que comprende una parte de gD y la citocina IL-13. Dicho virus puede infectar células que expresan el receptor IL-13R α 2. Debido a que IL-13R α 2 se expresa en la superficie de las células de los gliomas malignos, el VHS que contiene la proteína de fusión gD/IL-13 se dirige eficazmente a dichas células. Son particularmente útiles los ligandos que se unen a receptores que se sobreexpresan o se expresan diferencialmente en células tumorales o células asociadas con el crecimiento tumoral (por ejemplo, la neovasculatura). Los ejemplos incluyen las integrinas $\alpha_v\beta_3$ - $\alpha_v\beta_5$, que se sobreexpresan en la neovasculatura tumoral; el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se sobreexpresa en las células de cáncer de cabeza, cuello, pulmón, colon, mama y cerebro; HER-2/Neu, que se sobreexpresa en las células de cáncer de mama; MUC-1, que se sobreexpresa en las células de cáncer de mama, pulmón y páncreas; y el antígeno de membrana específico de la próstata, que se sobreexpresa en las células de cáncer de próstata. El ligando puede ser un anticuerpo monocatenario que se une a su miembro de par de unión

específico afín, denominado en el presente documento receptor. Se ha demostrado que los anticuerpos monocatenarios son eficaces en aplicaciones dirigidas, como lo demuestra su capacidad para dirigir retrovirus a receptores específicos. El ligando usado en la presente invención es el ligando peptídico IL13.

5 Esencialmente, se pueden usar dos pares de miembros o parejas de unión como receptores-ligandos. Sin embargo, se contempla que ciertos factores, tales como la distancia desde el sitio de unión del receptor hasta la membrana, o la configuración del ligando cuando se fusiona con gD, pueden afectar a la eficacia de la fusión de VHS recombinante a la membrana celular. Por lo tanto, se contemplan selecciones de pares de receptor-ligando eficaces, usando nada más que procedimientos habituales conocidos en la técnica. Se pueden usar selecciones adicionales, convencionales
10 en la naturaleza, para optimizar construcciones. Un método habitual de selección es seguir el protocolo proporcionado en el ejemplo para pares de receptor/ligando candidatos, usando IL-13R/IL-13 como un par de receptor/ligando de control.

15 Como alternativa, se puede usar un ensayo de fusión de membrana como se describe en Turner *et al.*, 1998. En el ensayo de Turner, se cultivan conjuntamente células transfectadas con una o varias construcciones que codifican gB, gH, gL y la proteína de fusión gD/ligando, y las células que expresan el receptor, y se examinan las células para determinar la fusión de membrana. La fusión de membrana entre las células que expresan gD/ligando y las células que expresan el receptor indica que el par candidato receptor-ligando (siendo el ligando una proteína de fusión gD/ligando) es funcional. Las construcciones que codifican proteínas funcionales de gD/ligando se pueden usar para
20 crear VHS recombinantes que se dirigen a las células que expresan el receptor.

Dirección a células

25 A partir de la descripción anterior resulta evidente que otro aspecto de la invención es la dirección de un VHS recombinante a una célula que tiene un receptor específico en su superficie. En realizaciones preferidas, se diseña un VHS recombinante para comprender un ligando que interactúe con un receptor que se sabe que se expresa en una célula de interés. La célula de interés se infecta con VHS recombinante. Dichos métodos de dirección pueden usarse para una variedad de fines.

30 En un aspecto, se usa un VHS recombinante para introducir un gen heterólogo en una célula que expresa el receptor. En realizaciones preferidas, la célula no está infectada o está poco infectada por VHS de tipo silvestre. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la invención proporciona un vector para transformar una célula de interés con un gen heterólogo.

35 Además, una célula puede convertirse en la diana de un VHS recombinante de la invención. La célula puede convertirse en una diana transformando la célula para que exprese un receptor capaz de unirse específicamente a un ligando expresado en un VHS recombinante de la invención. Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2, la estirpe celular J1.1, que era resistente a la infección por un VHS recombinante que expresaba un ligando IL-13, se hizo susceptible a la infección transformando la estirpe celular con un vector codificantes de IL12R α 2 para producir la
40 estirpe celular J13R.

45 En realizaciones de la invención diseñadas para tratar enfermedades, trastornos o afecciones asociados con una proliferación celular excesiva o no deseada, tal como cáncer o reestenosis, el VHS se dirige a las células en proliferación, matando así a las células. Debido a que el VHS es letal para las células infectadas, no se requiere la expresión de un gen heterólogo. Sin embargo, en realizaciones en las que se atenúa la letalidad del VHS, se puede usar un VHS que alberga un gen que es letal para la célula infectada o que evita la proliferación de la célula infectada para dirigirse a una célula.

50 Como alternativa, el VHS dirigido a marcadores de superficie específicos se puede usar para visualizar la distribución de las células tumorales en los tejidos. Esta herramienta de diagnóstico no estaba disponible debido a la unión indiscriminada del VHS a las células. La modificación del VHS mediante la eliminación (ablación) o la reducción de la unión indiscriminada del VHS a los proteoglicanos de sulfato de heparán sin afectar de manera nociva a la capacidad de dicho VHS de replicarse tanto en las células en división como en las que no se dividen hace posible el uso de estas formas víricas modificadas para visualizar la distribución de las células tumorales.

55 En un método preferido para visualizar la distribución de las células tumorales, se logra la visualización radioactiva mediante la incorporación de un precursor radiactivo dependiente de la timidina quinasa (TK) vírica. Los métodos de formación de imágenes moleculares de la expresión génica son bien conocidos en la técnica. Los métodos suelen usar técnicas de detección altamente sensibles tales como la tomografía por emisión de positrones (PET) o la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT). En una realización, la expresión de TK se mide usando un análogo de ganciclovir, tal como 9-(3-[¹⁸F] fluoro-1-hidroxi-2-propoxi)metilguanina, como el indicador o marcador (Vries *et al.*, 2002). Para una revisión de la expresión del gen de TK de generación de imágenes usando PET o SPECT, véase Sharma *et al.*, 2002 o Vries *et al.*, 2002.

65 Un segundo método de generación de imágenes preferido es fusionar una proteína del tegumento no crítica (por ejemplo, Us11, que está presente en casi 2.000 copias por partícula de virus) a una proteína marcadora, tal como la

proteína verde fluorescente, que es capaz de ser visualizada *in vivo*. Como alternativa, se puede fusionar una proteína no crítica con una luciferasa, y visualizarse la presencia de la luciferasa con un sustrato de luciferasa luminiscente o cromática. Aunque una proteína marcadora puede fusionarse esencialmente con cualquier proteína estructural vírica, las proteínas víricas preferidas incluyen gC, gE, gI, gG, gJ, gK, gN, U_L11, U_L13, U_L14, U_L21, U_L41, U_S35, U_S45, U_S46, U_S47, U_S51, U_S55, U_S56, U_S10 y U_S11. La proteína marcadora también puede fusionarse con la timidina quinasa (Soling *et al.*, 2002).

Exploración de genotecas

Como se ha señalado anteriormente, el VHS que comprende una proteína de fusión gD/ligando puede unirse e infectar células que expresen un receptor para el ligando. Por ejemplo, en la selección de ligandos del receptor, se usa una estirpe celular que expresa un receptor. Se clona ADNc de una genoteca de ADNc en un vector que codifica una parte de gD para producir una proteína de fusión codificada por gD/ADNc. Los vectores resultantes se seleccionan para la fusión de membrana usando el ensayo de Turner *et al.* descrito anteriormente o creando VHS recombinantes que expresen la proteína de fusión codificada por gD/ADNc y seleccionando los virus que tengan capacidad de infectar células que expresen el receptor. Dichos métodos se pueden usar, por ejemplo, para identificar un ligando de un receptor huérfano.

En otras realizaciones, se seleccionan mutaciones o variantes del receptor o ligando para determinar si los mutantes o las variantes mantienen la capacidad de interactuar con la pareja respectiva. Dichos métodos pueden ser útiles para determinar los restos específicos importantes en la interacción de receptor-ligando.

Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la invención es el uso del VHS dirigido en métodos terapéuticos. Al alterar las propiedades de unión celular e infectividad del virus, se vuelven viables muchas vías y métodos de administración. Por ejemplo, el VHS no dirigido se unirá indiscriminadamente a una variedad de células. Debido a esta propiedad, se usan grandes cantidades de virus y, en general, la administración intravenosa no es eficaz. Sin embargo, mediante la dirección del virus, se puede reducir la carga vírica (es decir, la cantidad de virus), pero mantener o aumentar la eficacia. Además, el VHS dirigido puede administrarse por vía intravenosa y producir efectos terapéuticos.

Los usos terapéuticos de la invención incluyen aquellos en los que se dirige un VHS a un receptor de una célula que contribuye, o es la base de, una enfermedad o un trastorno. Estos VHS dirigidos pueden aprovechar las propiedades terapéuticas del propio VHS (por ejemplo, la letalidad del VHS hacia las células infectadas) o el VHS dirigido puede servir como un vector para la administración dirigida de al menos un polinucleótido terapéutico, tal como un polinucleótido expresable que comprende una región codificante. Por ejemplo, en métodos en los que el VHS dirigido contiene uno o más productos génicos que hacen que el virus sea tóxico para la célula o que evitan o inhiben la proliferación celular, se sobreexpresa o se expresa selectivamente un receptor preferido en células dañinas o no deseadas, tales como las células cancerosas. En otras realizaciones, el VHS dirigido codifica un producto génico que proporciona una función o actividad deseada en la célula diana, por ejemplo, cuando una célula tiene uno o más defectos genéticos que impiden que la célula funcione correctamente.

En algunas realizaciones, se administra una composición de VHS dirigido de la invención a un paciente en o alrededor del sitio de un tumor, lo que es un método muy eficaz para contrarrestar la enfermedad clínica. Como alternativa, en otras circunstancias, puede ser apropiada la administración sistémica de composiciones de VHS dirigido, por ejemplo, cuando se ha producido una metástasis extensa o cuando se encuentran tumores inaccesibles.

Se contempla que, en ciertas realizaciones de la invención, se dirige una proteína que actúa como un inhibidor de la angiogénesis a un tumor. Asimismo, se puede administrar un agente inhibidor de la angiogénesis en combinación con un VHS dirigido de la invención. Estos agentes incluyen, por ejemplo, Marimastat (British Biotech, Annapolis MD; indicado para cánceres de pulmón no microcíticos, de pulmón microcíticos y de mama); AG3340 (Agouron, LaJolla, CA; para el glioblastoma multiforme); COL-3 (Collagenex, Newtown PA; para los tumores cerebrales); Neovastat (Aeterna, Quebec, Canadá; para el cáncer de riñón y de pulmón no microcítico) BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT; para el cáncer de pulmón metastásico no microcítico); Thalidomide (Celgen; para el melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de ovario y de próstata metastásico; sarcoma de Kaposi; cáncer colorrectal recurrente o metastásico (con adyuvantes); sarcomas ginecológicos, cáncer de hígado; mieloma múltiple; LLC, cáncer cerebral recurrente o progresivo, mieloma múltiple y de pulmón no microcítico, de próstata no metastásico, mieloma múltiple refractario y cáncer renal); Eculamina (Magainin Pharmaceuticals Plymouth Meeting, PA; cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de ovario); Endostatina (EntreMED, Rockville, MD; para tumores sólidos); SU5416 (Sugen, San Francisco, CA; cáncer de cabeza y cuello recurrente, tumores sólidos avanzados, cáncer de mama en estadio IIIB o IV; cáncer de cerebro (pediátrico) recurrente o progresivo; cáncer de ovario, LMA (leucemia mielóide aguda); glioma, tumores malignos avanzados, cáncer colorrectal avanzado, enfermedad de von-Hippel Lindau, cáncer avanzado de tejidos blandos; cáncer de próstata, cáncer colorrectal, melanoma metastásico, mieloma múltiple, mesotelioma maligno; renal metastásico, cáncer de cabeza y cuello avanzado o recurrente, cáncer colorrectal metastásico); SU6668 (Sugen San Francisco, CA; tumores avanzados); interferón α ; anticuerpo anti-VEGF (Instituto Nacional del Cáncer, Bethesda MD; Genentech San Francisco, CA, para tumores sólidos refractarios; cáncer metastásico de células

renales, en cáncer colorrectal avanzado no tratado; EMD121974 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, para el sarcoma de Kaposi relacionado con el VIH y el glioma anaplásico progresivo o recurrente); Interleucina 12 (Genetics Institute, Cambridge, MA, para el sarcoma de Kaposi) e IM862 (Cytran, Kirkland, WA, para el cáncer de ovario, cánceres metastásicos no tratados de colon y de origen rectal, y sarcoma de Kaposi). La información entre paréntesis que sigue a los agentes indica los cánceres contra los que se usan los agentes en estos ensayos. Se contempla que cualquiera de estos trastornos se pueda tratar con las composiciones de VHS dirigido de la invención, ya sea solo o en combinación con los agentes enumerados.

Para preparar una composición terapéutica para uso clínico, será necesario preparar la composición terapéutica como una composición farmacéutica, es decir, en una forma apropiada para aplicaciones *in vivo*. En general, esto implicará preparar composiciones que estén esencialmente exentas de pirógenos, así como de otras impurezas que puedan ser dañinas para los seres humanos u otros vertebrados.

En general, se incluyen sales y tampones apropiados para hacer que los vectores de administración sean estables y permitir la absorción por parte de las células diana. Las composiciones acuosas de la invención comprenden una cantidad eficaz del VHS dirigido, disuelto o dispersado en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones también se denominan inóculos. La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen efectos adversos, reacciones alérgicas u otras reacciones desfavorables cuando se administran a un animal o ser humano. Como se usan en el presente documento, "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. A menos que un medio o agente convencional sea incompatible con los vectores de la invención o con el sujeto destinado a recibir el tratamiento, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos o ingredientes inertes complementarios a las composiciones.

Las composiciones activas de la invención incluyen preparados farmacéuticos convencionales. La administración de estas composiciones de acuerdo con la invención se realiza por cualquier vía conocida, siempre que sea posible acceder al tejido diana a través de esa vía. Las composiciones farmacéuticas pueden introducirse en el sujeto mediante cualquier método convencional, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intravesicular, intrapulmonar (por ejemplo, liberación en un plazo); sublingual, nasal, anal, vaginal o transdérmica, o mediante implantación quirúrgica en un sitio en particular. El tratamiento puede consistir en una dosis única o una pluralidad de dosis durante un período de tiempo.

Tras la formulación, las soluciones se administran de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las dosis apropiadas pueden determinarse mediante el uso de ensayos de rutina establecidos. A medida que se realizan los estudios, surgirá más información sobre los niveles de dosificación óptimos y la duración del tratamiento para enfermedades, trastornos y afecciones específicos.

En realizaciones preferidas, la dosis unitaria puede calcularse en términos de la dosis de partículas víricas que se administren. Las dosis víricas se definen como un número determinado de partículas víricas o unidades formadoras de placa (ufp). Las dosis unitarias particulares incluyen 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} ufp. Las dosis de partículas pueden ser algo superiores (de 10 a 100 veces) debido a la presencia de partículas defectuosas para la infección, que se pueden determinar mediante ensayos de rutina conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas y los usos de tratamiento de la invención son útiles en los campos de la medicina humana y la medicina veterinaria. Por lo tanto, el sujeto que se va a tratar puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, preferentemente, un ser humano. Para fines veterinarios, los sujetos incluyen, por ejemplo, animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos y cabras, animales de compañía, tales como perros y gatos, animales exóticos y/o de zoo, animales de laboratorio, incluyendo ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsters; y aves de corral tales como pollos, pavos, patos y gansos.

En algunas realizaciones de la invención, se contempla que el VHS dirigido se administre junto con una intervención quimioterapéutica o radioterapéutica, inmunoterapia, o con cualquier otra terapia empleada convencionalmente en el tratamiento del cáncer.

Para matar células, inhibir el crecimiento celular, inhibir la metástasis, inhibir la angiogénesis, o revertir o reducir los fenotipos malignos usando los métodos y las composiciones de la invención, se pone en contacto una célula "diana", un tumor o su vasculatura con una composición de VHS dirigido y al menos otro agente. Los componentes de estas composiciones se proporcionan en una cantidad combinada eficaz para matar o inhibir la proliferación de células cancerosas. Este proceso puede implicar la puesta en contacto de las células con la composición de VHS dirigido y el/los agente/s o factor/es al mismo tiempo. Esto se puede lograr poniendo en contacto al organismo, o la célula de interés, con una sola composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo o en diferentes momentos, de modo que una composición incluye una composición de VHS dirigido de la invención y la otra composición incluye el segundo agente.

Otro aspecto de la invención proporciona métodos de diagnóstico que implican la generación de imágenes de un tumor o tejido enfermo usando un VHS dirigido. Dichos métodos son útiles para diagnosticar a un paciente con una enfermedad, trastorno o afección que esté indicado por la presencia de un receptor en la superficie de una célula. Los métodos de diagnóstico mediante generación de imágenes se han analizado anteriormente.

Kits

Los kits pueden incluir virus recombinantes de la invención o pueden incluir vectores para producir dichos virus recombinantes. Un vector para producir un virus recombinante de la invención puede codificar la proteína de fusión gD/ligando o puede diseñarse para facilitar la clonación de un ligando para producir una proteína de fusión gD/ligando (por ejemplo, un vector que contenga un sitio de clonación múltiple dentro de la región codificante de gD que facilite las inserciones en marco).

Otros componentes que se pueden incluir en un kit incluyen una estirpe celular que exprese el receptor (útil como control), una molécula de ácido nucleico para expresar el receptor en un tipo de célula particular e instrucciones para usar el kit con el fin de efectuar análisis de diagnóstico o tratamientos terapéuticos. En determinadas realizaciones, un kit terapéutico contendrá además un componente para lograr un efecto terapéutico, tal como un profármaco o un compuesto tóxico. En otras realizaciones, un kit de diagnóstico contendrá un compuesto útil en métodos de generación de imágenes, tal como un cromóforo o fluoróforo, o un anticuerpo para detectar células infectadas.

Habiendo proporcionado una descripción general de los diversos aspectos de la invención, la siguiente divulgación proporciona ejemplos ilustrativos de la invención, en la que el Ejemplo 1 describe la construcción de un VHS dirigido, El Ejemplo 2 ilustra la construcción de una estirpe celular que expresa un VHS dirigido, y el Ejemplo 3 describe la infección controlada de una célula deseada por un VHS dirigido.

Ejemplo 1

Construcción del vector de dirección de VHS R5111

Se construyó un VHS dirigido para dirigir el virus recombinante a células de gliomas malignos. La diana para la entrada del virus en dichas células es el receptor IL13R α 2, que se sabe que está presente en los gliomas malignos. A diferencia del receptor IL13R α 1 más frecuente, el receptor IL13R α 2 tiene un dominio citoplasmático más corto y no interactúa con IL4, del que IL13 es un pariente cercano. En general, La construcción del VHS dirigido implicó la mutagenización de gB y de gC para impedir su interacción con el sulfato de heparán. Asimismo, se insertó IL13 en gD en el aminoácido 24 interrumpiendo así el sitio de unión de gD para el HveA. El virus quimérico IL13-gD resultante puede usar IL13R α 2 para entrar en las células portadoras de ese receptor.

Más específicamente, el VHS dirigido R5111 se construyó en varios etapas representadas en los cuatro paneles de la Figura 1 y que se detallan a continuación.

(i) Sustitución del dominio amino terminal de gC con IL13 fusionado a la secuencia señal de gC. La Figura 1A, las líneas 1-3 representan esquemáticamente un ADNc que consiste en la secuencia codificante de IL13 fusionada en su extremo amino a su secuencia señal. El ADNc completo de IL 13, con la región codificante del péptido señal N-terminal, se amplificó usando el método de elongación con cebador de PCR. Los cebadores fueron los siguientes:

pIL13F1,

CATTGCTCTCACTTGCCTTGGCGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGC-

CTCCCTCTACAGC (SEQ ID NO:1);

pIL13F2,

GCAGCTAGCCTCATGGCGCTTTTGTGACCACG-

GTCATTGCTCTCACTTGCCTTGGCGGC (SEQ ID NO:2);

y pIL13REcoRI,

GAGCTCGGATCCTGAATTC AACCGTCCCTC (SEQ ID NO:3).

La primera serie de PCR usó pIL13F1 y pIL13REcoRI como cebadores, con pRB5830 (que contiene la región

codificante de IL13) como molde. Después, se diluyó la mezcla de reacción de PCR 10 veces y se usó 1 µl de la mezcla de reacción diluida como molde para la segunda serie de amplificaciones de PCR con pIL13F2 y pIL13REcoRI como conjunto de cebadores. El producto de PCR se purificó en gel, se digirió con NheI/EcoRI y se ligó a pBluescript II KS (+) en los sitios XbaI/EcoRI para generar pRB5832. Para construir el plásmido de transferencia pRB5835, se liberó un fragmento HindIII/SacI de 4,8 kpb que contenía la región codificante de gC del VHS-1 del cósmido pBC1007 y se insertó en pBluescript II KS (+) para generar pRB5833. pRB5833 se escindió con NheI y EcoRI, y los 148 restos N-terminales de gC se reemplazaron con la secuencia química de señal gC/IL13 (pRB5834). Se liberó la inserción de pRB5834 mediante digestión con XhoI/SacI y se ligó a pKO5Y en los mismos sitios para generar pRB5835.

El virus recombinante R5107 (Figura 1A, línea 1) portador de la quimera IL13-gC se generó con la ayuda del sistema BAC-VHS. Las células competentes RR1 que albergaban los bácmidos del cromosoma artificial bacteriano (BAC)-VHS se transformaron con el plásmido de transferencia pRB5835 por electroporación. Tras la incubación durante 1 hora a 30 °C en caldo LB, se sembraron las bacterias transformadas en placas de Zeocina (Zeo) previamente calentada más cloranfenicol (Cm) (20 µg/ml de cada) y se incubaron durante la noche a 43 °C para la integración. Al día siguiente, se recogieron seis colonias, y se diluyó cada una por separado en 1 ml de LB. A continuación, se sembraron cinco µl de las bacterias diluidas en placas de Cm/sacarosa (Suc) al 10 %, y se incubaron a 30 °C durante la noche. Para confirmar con mayor seguridad la pérdida del vector de reemplazo, se volvieron a sembrar en estrías 24 colonias resistentes a Cm/Suc (cuatro colonias de cada placa) por duplicado en placas de LB con Cm y LB con Zeo, respectivamente. Las colonias de Suc^r/Cm^r/Zeo^r se exploraron adicionalmente mediante PCR (95 °C, 4 minutos para el ciclo 1; luego 35 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 60 °C, 1 minuto; y 72 °C, 1 minuto). Los cebadores fueron:

pgC-F,
GACACGGGCTACCCTCACTATCGAGGGC (SEQ ID NO:4; de nt 96158 a 96185 en la cepa 17 de VHS-1),
y pgC-R,
GGTGATGTTTCGTCAGGACCTCCTCTAGGTC (SEQ ID NO:5; de nt 96859 a 96830 en la cepa 17 de VHS-1).

Se secuenció el fragmento de ADN amplificado a partir de clones positivos para la PCR (Figura 2B) para confirmar con mayor seguridad la integración de IL13 en el marco abierto de lectura (ORF) correcto de gC. Para verificar la viabilidad del recombinante (R5607), se preparó el ADN de BAC-VHS recombinante como se describe en otra parte (Ye *et al.*, 2000) y se transfirió en células de piel de conejo mediante el reactivo Lipofectamine (Life Technologies, Grand Island, NY). El virus resultante, R5607, se almacenó a -80 °C.

(ii) Eliminación del rastro de la polilisina de gB, Figura 1 panel B. Para fabricar un plásmido de transferencia para la eliminación del dominio de unión a sulfato de heparán de gB (polilisina), se formó un fragmento BstEII de 4,76 kpb (del nt 53164 a 57923 de VHS-1) que contenía el ORF de U₁27 (gB) liberado del cósmido BC1014 con los extremos romos y se clonó en pBluescript II KS (+) en un sitio SmaI para generar pRB5846. Para construir pRB5847, del que se eliminó el dominio de polilisina de 10 aminoácidos de gB, se amplificaron dos fragmentos que flanqueaban el dominio de polilisina mediante PCR a partir de pRB5846. Los conjuntos de cebadores fueron:

pgB1BamHI:
GTTCTTCTTCGGTTTCGGATCCCCCG (SEQ ID NO:6);
pgB2BspEI:
CGGCATTTCCGGAATAACGCCCACTC (SEQ ID NO:7);
y pgB3BamHI:
CAGAAAACCGGATCCCCCAAAGCCGCC (SEQ ID NO:8);
pgB4BsiWI:
GCCAACACAAACTCGTCGTACGGGTAC (SEQ ID NO:9).

Los fragmentos amplificados por PCR se cortaron con BspEI/BamHI o BsiWI/BamHI, y se ligaron en pRB5846, que tenía el fragmento BsiWI/BspEI de 1,2 kpb ya eliminado. Para generar el plásmido de transferencia pRB5848, se liberó la inserción de 4,76 kpb de pRB5847 mediante la digestión con XbaI/EcoRV y se ligó a pKO5Y en los sitios de XbaI y Scal. El virus VHS-1 recombinante R5108 se basa en R5107 con la eliminación adicional del dominio de unión a sulfato de heparán de gB. Se fabricó mediante el mismo procedimiento que BAC-R5607, excepto que se usó el plásmido de transferencia pRB5848 en lugar de BAC-VHS de tipo silvestre y pRB5835. La secuencia de la gB mutante se verificó secuenciando el ORF completo.

(iii) Eliminación de gD (Figura 1 panel C, líneas 6 y 7). Se reemplazó secuencia codificante de gD por el promotor temprano inmediato del citomagolovirus humano para permitir la expresión de la glicoproteína I. Se liberó un fragmento de 0,65 kpb que contenía el promotor de pRB5836 mediante la digestión con ClaI y se insertó en pgD (Figura 6), un plásmido obtenido de G. Campadelli-Fiume. Este plásmido, que contenía las secuencias flanqueantes de gD, pero que carecía del QRF de gD, había sido cortado con ClaI para generar pRB5849. Luego se cortó pRB5849 con NotI y PmeI, y se ligó en pKO5Y en los sitios NotI y Scal para generar el plásmido de transferencia pRB5850. El virus VHS-1 recombinante R5110 se basa en R5608 con la eliminación adicional de gD. Se fabricó mediante el mismo procedimiento que BAC-R5607, excepto que se usó el plásmido de transferencia pRB5850 en lugar de BAC-VHS de tipo silvestre y pRB5835. El ADN de BAC-VHS recombinante se preparó como se describe en (Ye *et al.*, 2000). El virus mutante se designó R5110.

(iv) Construcción del R5111 mutante portador del gen quimérico IL-13-gD (Figura 1 panel D). El plásmido pRB123 porta un fragmento J de BamHI de 6.584 pb que contiene la región codificante de gD y las secuencias flanqueantes en el sitio BamHI de pBR322. Para construir el plásmido quimérico IL 13-gD, se digirió el pRB123 con AflII y HpaI para liberar dos fragmentos de 7,6 kb y 3,2 kb. El fragmento de 3,2 kb se digirió además con FspI para liberar fragmentos de 2,5 kb y 0,7 kb que contenían 661 pb amino terminales del ORF de gD. Se insertó una secuencia de polienlazador que contenía los sitios de restricción XhoI-BglII-EcoRI-KpnI en el fragmento de 0,7 kb en dirección 3' del codón 24 de gD mediante dos reacciones de PCR usando un primer cebador directo, 5'-CAGTTATCCTTAAGGTCTCTTTTGTGTGGTG-3' (SEQ ID NO: 10), y un primer cebador inverso,

5'-CCGGAATTCCGGAGATCTTCCCTCGAGGACCGGAAGGTCTTTGCCGCGA

AAG-3' (SEQ ID NO:11),

y un segundo cebador directo,

5'CCGGAATTCCGGGGTACCCTGGACCAGCTGACCGACCTCCGG-3' (SEQ ID NO: 12),

y un segundo cebador inverso,

5'-CGGGGGGATGCGCAGCGGGAGGGCGTACTTAC-3' (SEQ ID NO: 13), respectivamente. Tras la digestión de los dos productos de PCR por EcoRI, se ligaron y se amplificaron por PCR nuevamente, obteniéndose el fragmento de ADN deseado que contenía la inserción del polienlazador.

Se amplificó IL13 mediante PCR con el cebador directo,

5'-CCGCTCGAGATGGCGCTTTTGTGACCACGG-3' (SEQ ID NO: 14),

y el cebador inverso,

5'-GGGGTACCGTTGAACCGTCCCTCGCGAAA-3' (SEQ ID NO: 15),

y luego se insertó en los sitios XhoI y KpnI del fragmento de 0,7 kb descrito anteriormente. A continuación, se ligó este nuevo fragmento con la inserción de IL13 con los fragmentos de 2,5 kb y 7,6 kb (véase información anterior) para generar el plásmido de transferencia quimérico IL13-gD, pRB13-24.

R5111 se generó mediante la transfección simultánea del plásmido de transferencia pRB13-24 y el ADN vírico de R5110 en células de glioma U87. Se sembró la progenie de la transfección a una dilución alta en cultivos de células Vero y HEp-2 para producir placas individuales, bien espaciadas. De cada uno de los cultivos celulares infectados, se recogieron seis placas individuales, se sometieron a congelación-descongelación, se trataron con ultrasonidos, y luego se volvieron a sembrar en cultivos nuevos de células Vero o HEp-2 (dependiendo del origen de la placa) para la preparación de reservas de virus y para preparar ADN vírico para la secuenciación.

Extracción de ADN vírico. Se retiraron las células infectadas de cada uno de los matraces de 25 cm² expuestos a aislados de placa individuales, se enjuagaron y se volvieron a suspender en 500 µl de Lyse-O-Lot (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM en presencia de 0,1 % de NP40). Se retiraron los núcleos mediante centrifugación a baja velocidad. Al fluido sobrenadante, se añadieron dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,2 %, EDTA a 5 mM y β-ME a 50 mM. La solución se extrajo luego dos veces con fenol/cloroformo. Finalmente, se precipitó el ADN vírico en etanol, se volvió a suspender, y se amplificaron el ORF de IL13 y el marco de lectura quimérico de IL13-gD por PCR con dos conjuntos de cebadores. El primer conjunto, diseñado para amplificar IL13, consistió en: un cebador directo, 5'-CCGCTCGAGATGGCGCTTTTGTGACCACGG-3' (SEQ ID NO:16), y un cebador inverso, 5'-GGGGTACCGTTGAAC-CGTCCCTCGCGAAA-3' (SEQ ID NO:17), que amplificará el ORF de IL13. El segundo conjunto, diseñado para amplificar la unión IL13-gD, consistía en un cebador de unión directo, 5'-CCGCTCGAGATGGCGCTTTTGTGACCACGG-3' (SEQ ID NO:18), y un cebador de unión inverso, 5'-AACTGCAGGTTGTCGGGGTGGCCGGGG-3' (SEQ ID NO:19). Los 12 productos de PCR de IL13-gD se secuenciaron para determinar si la secuencia de gD contenía eliminaciones o sustituciones.

Verificación de la estructura de R5111 La construcción del virus R5111 se muestra en la Figura 1. El diseño implicó el reemplazo del sitio de unión de HveA con el ligando IL13 para permitir que el virus recombinante se uniera al receptor de IL13α2 en las superficies celulares y para eliminar las secuencias que se unían al sulfato de heparán según lo informado. La verificación de la estructura de R5111 se realizó de la siguiente manera:

(i) Inicialmente, se verificó el reemplazo del dominio amino-terminal de gC con IL13 y la interrupción del sitio de unión al sulfato de heparán secuenciando gC a partir de R5107 recombinante (Fig. 2 A).

(ii) Se verificó la eliminación de los codones 68-77 de gB secuenciando el ORF de gB amplificado por PCR a partir de R5108 recombinante (Fig. 2 B).

(iii) Se verificó la presencia de IL13-gD quimérico en R5111 por PCR, como se ilustra en la Figura 3, y secuenciando toda la región codificante de IL13-gD, amplificada por PCR, como se muestra en la Figura 2. El R5111 recombinante se aisló inicialmente de células U87 transfectadas y se cultivó en paralelo en células Vero y células HEp-2. Para determinar si el virus cultivado en células Vero o células HEp-2 difería con respecto a la secuencia de

aminoácidos, se recogieron seis placas de cada cultivo de Vero o HEp-2 que contenían placas bien separadas. En esta serie de experimentos de verificación, se usaron dos conjuntos de cebadores para confirmar la presencia de la inserción de IL13 en gD y para verificar la presencia de una unión entre IL13 y gD. En una segunda serie de verificaciones, se secuenciaron los 12 clones de gD para determinar si los aislados obtenidos de los virus pasados en células Vero o en células HEp-2 diferían en la secuencia de aminoácidos. No se encontraron diferencias. Asimismo, a excepción de la secuencia de IL13 insertada, no se encontraron diferencias entre la secuencia de gD de VHS-1 (F) y las de los genes quiméricos clonados de IL-13-gD (Fig. 2 C).

(iv) En geles de poliacrilamida desnaturalizantes, IL13 migró como una proteína con un Mr aparente de 15-17.000. En el R5111 recombinante, IL13 reemplazó 148 aminoácidos de gC. La Figura 4B muestra una inmunotransferencia de proteínas separadas electroforéticamente de un lisado de células infectadas con R5111 mutante expuestas a un anticuerpo contra gC. Como se ilustra en esa figura, el anticuerpo anti-gC reaccionó con proteínas presentes en lisados de VHS-1 (F) y con proteínas de lisados de R5111, mostrando movilidades electroforéticas similares. Por el contrario, un anticuerpo contra IL13 reaccionó con una banda de movilidad similar en los lisados de R5111 (Figura 4C, carril 3), pero no en los lisados de VHS-1 (F) (Figura 4C, carril 2). La proteína de fusión IL13-gD del virus R5111 mutante se verificó haciendo reaccionar los lisados celulares con el anticuerpo gD e IL13. La comparación de gD de tipo silvestre y la proteína quimérica IL13-gD quimérica (Fig. 4A, carril 3), mostró que, como se esperaba, IL13-gD migró más lentamente que la gD de tipo silvestre (Fig. 4A, carril 2). La banda de migración más rápida de gD no reaccionó con el anticuerpo contra IL13 (Figura 4C, carril 2).

Ejemplo 2

Construcción de una estirpe celular que expresa el receptor de IL13 (IL13R α 2)

Una prueba rigurosa de la capacidad de R5111 para utilizar la proteína IL13R α 2 como receptor para la entrada requería la construcción de una estirpe celular que expresara IL13R α 2 en ausencia de otros receptores de entrada de VHS-1. La estirpe celular J1.1 fue seleccionada para esta construcción. En esencia, esta estirpe celular carece de los receptores necesarios para la entrada del virus en las células y la estirpe celular no es susceptible a la infección por virus de tipo silvestre. A continuación, se describen la construcción de un plásmido codificante de una proteína IL13R α 2 fusionada en su extremo carboxilo a un marcador de HA, la transfección de células J1.1 con el plásmido que codifica la proteína ILR α 2 marcada y la selección de la estirpe celular que expresa la proteína.

Para evaluar la producción de la proteína IL13R α 2, se cosecharon cinco clones de las células seleccionadas, se solubilizaron, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes y se probaron para determinar la expresión de la proteína.

Construcción de J13R, una estirpe celular que expresa de forma estable el receptor IL13R α 2. Se marcó la región codificante de IL13 α 2 con un marcador de HA en su extremo 3' (el extremo carboxilo del polipéptido codificado) por PCR con cebador directo, 5'-AA- GATTTGGGC-TAGCATGGCTTTCTGTTTGC-3' (SEQ ID NO: 20), y el cebador inverso, 5'-TCCCTCGAAGCTTCAAGCAT- AATCTGGCACATCATATGTATCACAGAA-AAA-3' (SEQ ID NO: 21). Se usaron los productos de la digestión de restricción con NheI e HindIII para crear extremos compatibles. Luego se insertó el fragmento de ADN en el vector pcDNA 3.1 (zeo) (Invitrogen; Carlsbad, CA) para generar el plásmido de transferencia pRB13-R2. Todas las construcciones se secuenciaron para asegurar la fidelidad.

J1.1, un derivado de las células de timidina quinasa BHK que carecen de receptores de HveA y nectina 1, se obtuvo del Dr. G. Campadelli-Fiume, Universidad de Bolonia, Italia, las células J1.1, transfectadas de manera estable con pRB 13-R2 usando un kit de lipofectamina (Gibco-BRL), se seleccionaron en función de su resistencia a la zeocina (Invitrogen). Se amplificaron clones resistentes a la zeocina y se seleccionaron para la expresión de IL13R α 2 mediante inmunotransferencia con anticuerpo policlonal anti-HA. Se separaron electroforéticamente lisados de las células parentales y transformadas formadas mediante solubilizados en SDS en un gel desnaturalizante (50 μ g/carril), se transfirieron a una lámina de nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpo contra HA (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas de proteínas se visualizaron mediante un sistema mejorado de detección quimioluminiscente (ECL) (Pierce, Rockford, IL.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionó una (J13R-2) para probar la capacidad de R5111 de usar el receptor IL13R α 2.

Como se muestra en la Figura 5, todos los clones expresaron una banda de proteína reactiva con el anticuerpo anti-HA. El tamaño aparente de la proteína coincidió con el tamaño informado de IL13R α 2. De 5 clones positivos en J13R, se seleccionó J13R-2 (Fig. 5, carril 3), y se designó J13R.

Ejemplo 3

Infección por el vector de dirección al VHS R5111

Se obtuvieron células SK-N-SH, HEp-2, Vero y U87 de la colección americana de cultivos tipo (Rockville, MD) y se mantuvieron en la modificación de Dulbecco del medio esencial mínimo de Eagle (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 %. Se expusieron cultivos replicados de SK-N-SH, HEp-2, Vero, U87, J1.1 y J13R a 0,01 UFP del virus R5111 por célula. Después de 24 horas de incubación, se cosecharon las células y se valoraron los rendimientos

víricos en células Vero.

Immunotransferencia de proteínas separadas electroforéticamente. Se infectaron de forma simulada las células indicadas o se expusieron a 10 UFP de VHS-1 (F) recombinante o de tipo silvestre por célula. Las células se cosecharon 24 horas después de la infección, se interrumpieron en el tampón de interrupción de SDS, se hirvieron, se aclararon por centrifugación y se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10 %. Tras la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se hicieron reaccionar las proteínas aisladas con anticuerpos como se indica usando técnicas conocidas y convencionales. Se adquirieron anticuerpos monoclonales contra gD- (clon H170), antiseros policlonales específicos de gC y HA en el Instituto Goodwin, Plantation, Florida. Se adquirieron anticuerpos policlonales contra IL13 en Santa Cruz Biotechnology.

Los resultados mostrados en la Tabla 1 fueron los siguientes: R5111 se replicó dentro de un intervalo de 10 veces en células HEp-2, Vero, U87 y J13R. El título obtenido de las células J1.1 fue aproximadamente 10^5 veces inferior al obtenido de todas las demás estirpes celulares. Para probar si la estirpe celular J13R había adquirido un receptor para VHS-1 de tipo silvestre (VHS-1 (F)), las células J1.1 y J13R también se expusieron al virus de tipo silvestre. Los resultados, también mostrados en la Tabla 1, indican que las células siguen siendo resistentes al virus de tipo silvestre. Se sabía que las células HEp-2 expresan el receptor de nectina, pero no el receptor de HveA. Los resultados muestran que el VHS dirigido que contiene una fusión IL13-gD puede dirigirse (es decir, unirse e infectar) a células que expresan un determinado receptor (IL13R α 2) aproximadamente igual a como el VHS de tipo silvestre se dirige a células que expresan el receptor de HveA. Los resultados indican que R5111 puede usar IL13R α 2 como receptor para entrar en una estirpe celular que carezca del resto de los receptores de VHS-1.

Tabla 1
Replicación de R5111 en diferentes estirpes celulares

Virus	Estirpe celular*	Rendimiento**
R5111	Vero	11×10^7
	HEp-2	$1,2 \times 10^7$
	SK-N-SH	17×10^7
	U87	27×10^7
	J1.1	2×10^2
	J13R	11×10^7
VHS-1(F)	J1.1	6×10^3
	J13R	4×10^3

* estirpes celulares derivadas de tumores cerebrales humanos.

** Las células se expusieron a 0,01 UFP de R5111 o VHS-1 (F) por célula y se cosecharon 24 horas después de la infección. El virus de la progenie se valoró en células Vero.

La presente divulgación contiene una descripción ilustrativa de la construcción y las propiedades de un virus VHS recombinante, R5111. En R5111, se eliminaron los sitios de unión al sulfato de heparán en la superficie de la partícula vírica para impedir o al menos reducir la unión del virus a las células no diana. La unión incluso en ausencia de actividad fusogénica puede conducir a endocitosis, degradación de la partícula vírica y posible daño a la célula por enzimas lisosomales (Zhou *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2000). Al mismo tiempo, se insertó una copia de IL13 en gC para potenciar la unión de las partículas de virus al receptor IL13R α 2. La principal restructuración del genoma vírico consistió en la inserción de IL13 en el aminoácido 24 de gD. Los datos disponibles indican que esta modificación elimina el sitio de unión de gD para el receptor de HveA (Carfi *et al.* 2001). Los datos obtenidos usando R5111 indican que el virus conserva la capacidad de interactuar con el receptor de nectina. Sin embargo, el VHS dirigido R5111 pudo infectar y replicarse en células J13R, pero no en las células parentales, las células J1.1.

Referencias

- Davis F. G., Freels S., Grutsch J., Barlas S., Brem S. (1998) *J. Neurosurg.* 88:1-10.
- Pyles R. B., Warnick R. E., Chalk C. L., Szanti B. E., Parysek L. M. (1997) *Hum Gene Ther.* 8(5):533-44.
- Ramplung R., Cruickshank G., Papanastassiou V., Nicoll J., Hadley D., Brennan D., Petty R., MacLean A., Harland J., McKie E., Mabbs R., Brown M. (2000) *Gene Ther.* 7(10):859-66.
- McKie E. A., Brown S. M., MacLean A. R., Graham D. I. (1998) *Neuropathol Appl Neurobiol.* 24(5):367-72.
- Markert J. M., Medlock M. D., Rabkin S. D., Gillespie G. Y., Todo T., Hunter W. D., Palmer C. A., Feigenbaum F., Tornatore C., Tufaro F., Martuza R. L. (2000) *Gene Ther.* 7(10):867-74.
- Mineta T, Rabkin S. D., Yazaki T., Hunter W. D., Martuza R. L. (1995) *Nat Med.* 1(9):938-43.
- Simard C., Langlois I., Styger D., Vogt B., Vleck C., Chalifour A., Trudel M., Schwyer M. (1995) *Virology.* 212(2):734-40.
- Chou J., Chen J. J., Gross M., Roizman B. (1995) *Proc Natl Acad Sci.* EE.UU. 92(23):10516-20.
- He B., Chou J., Brandimarti R., Mohr I., Gluzman Y., Roizman B. (1997) *J Virol.* 71(8):6049-54

- Cassady K. A., Gross M., Roizman B. (1998) *J Virol.* 72(9):7005-11.
- Leib, D. A., Harrison, T. E., Laslo, K. M., Machalek, M. A., Moorman N. J. y Virgin, H.A.W. (1999) *J. Exp. Med.* 189:663-672.
- Laquerre S., Argnani R., Anderson D. B., Zucchini S., Manservigi R., Glorioso J. C. (1998). *J Virol.* 72(7):6119-30.
- 5 Spear, P. G., R. J. Eisenberg y G. H. Cohen. (2000) *Virology* 275: 1-9.
- Montgomery, R. I., M. S. Warner, B. J. Lum y P.G. Spear. (1996) *Cell* 87:427-436.
- Campadelli-Fiume, G., F. Cocchi, L. Menotti y M. Lopez. (2000) *Reviews in Medical Virology.* 10:305-319.
- Zhou G., Roizman B. (2002) *J Virol.* 76(12):6197-204.
- Debinski W., Gibo D. M., Hulet S. W., Connor J. R., Gillespie G. Y. (1999) *Cancer Res.* 5:985-990.
- 10 Mintz A., Gibo D. M., Slagle-Webb B., Christensen N. D., Debinski W. (2002) *Neoplasia* 4:388-399.
- Debinski W. (1998) *Crit. Rev. Oncogen.* 9:255-268.
- Debinski W., Gibo D. M. (2000) *Mol. Med.* 6:440-449.
- Zhou G., Roizman B. (2001) *J Virol.* 75(13):6166-72.
- Arsenakis M., Tomasi L. F., Speziali V., Roizman B., Campadelli-Fiume G. (1986) *J Virol.* 58(2):367-76.
- 15 Ye G. J., Roizman B. (2000) *Proc Natl Acad Sci, EE.UU.* 97(20):11002-7.
- Zhou G., Galvan V., Campadelli-Fiume G., Roizman B. (2000) *J Virol.* 74(24):11782-91.
- Carfi A., Willis S. H., Whitbeck J. C., Krummenacher C., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Wiley D. C. (2001) *Mol Cell.* 8(1):169-79.
- Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P y Campadelli-Fiume, G. (1998) *J. Virol.* 72:9992-10002.
- 20 Debinski W., Thompson J. P. 1999. *Clin Cancer Res.* 5(10 Supl):3143s-3147s.
- Brooks, P. C., Clark, R. A. F. y Cheresch, D. A. "Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis". *Science* 264:569-571, 1994.
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., H. U., T., Klier, G y Cheresch, D. A. "Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels". *Cell* 79:1157-1164, 1994.
- 25 Burger, M. J., Tebay, M. A., Keith, P. A., Samaratunga, H. M., Clements, J., Lavin, M. F. y Gardiner, R.A. "Expression analysis of δ -Catenin and prostate-specific membrane antigen: Their potential as diagnostic markers for prostate cancer". *Int. J. Cancer* 100:228-237, 2002.
- Ellerman, T. C., Domagala, T., McKern N.T. *et al.*, "Identification of the determinant of Epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using truncated, high affinity form of the ectodomain". 2001 *Biochemistry* 40 8930-8939.
- Genbitsky, D. S., Bozso, Z., O'Flaherty, M. *et al.*, 2001 "A specific binding site for a fragment of the B-loop of epidermal growth factor and related peptides". *Peptides* 23:97-102 A.
- 35 Urbanelli, L., Ronchini, C., Fontana, L. *et al.*, "Targeted gene transduction of mammalian cells expressing the HER2/neu receptor by filamentous phage". *J Mol Biol.* 2001 Nov 9;313(5):965-76.
- Hayashi, T., Takahashi, T., Motoya, S., *et al.* "MUC1 Mucin core protein binds to the dfomasin of ICAM-1" 2001 *Digestion* 63:87-92.
- Fracasso, G., Bellisola, G., Cingarlini, S., Castelletti, D., Prayer-Galletti, T., Pagano, F., Tridente, G. y Colombatti, M. "Anti-tumor effects of toxins targeted to the prostate specific membrane antigen". *Prostate* 53:9-23, 2002.
- 40 Mabweesh, N. J., Zhong, H. y Simons, J. W. "Gene therapy of prostate cancer: current and future directions". *Endo. Related Cancer* 9:115-139, 2002.
- Ross, S., Spencer, S. D., Holcomb, I., Tan, C., Hongo, J., Devaux, B., Rangell, L., Keller, G.A., Schow, P., Steeves, R. M., Lutz, R. J., Frantz, G., Hillan, K., Peale, F., Tobin, P., Eberhard, D., Rubin, M. A., Lasky, L. A. y Koeppen, H. "Prostate stem cell antigen as therapy target: Tissue expression and *in Vivo* efficacy of an immunoconjugate".
- 45 *Cancer Res.* 62:2546-2553, 2002.
- Ruoslahti, E. "RGD and other recognition sequences for integrins". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715, 1996.
- Thomas, J., Gupta, M., Grasso, Y., Reddy, C. A., Heston, W.D., Zippe, C., Dreicer, R., Kupelian, P. A., Brainard, J., Levin, H. S. y Klein, E. A. "Preoperative combined nested reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen does not correlate with pathologic stage or biochemical failure in patients with localized prostate cancer undergoing radical prostatectomy". *J. Clin. Oncol.* 20:3213-3218, 2002.
- Lorimer y Lavictoire, "Targeting retrovirus to cancer cells expressing a mutant EGF receptor by insertion of a single chain antibody variable domain in the envelope glycoprotein receptor binding lobe", *J Immunol Methods* 237(1-2):147-57, 2000.
- 55 Turner *et al.*, "Glycoproteins gB, gD, and gHgL of Herpes Simplex Virus Type 1 are Necessary and Sufficient to Mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system", *J of Virol*, 72(1): 873-75, 1998.
- Brunetti *et al.*, "Herpes Simplex Virus gD and Virions Accumulate in Endosomes by Mannose 6-Phosphate-Dependent and -Independent Mechanisms", *J of Virol*, 72(4):3330-3339, 1998.
- Sharma *et al.*, "Molecular imaging of gene expression and protein function *in vivo* with PET and SPECT", *J Magn Reson Imaging*, 16(4):336-51, 2002.
- 60 Vries *et al.*, "Scintigraphic Imaging of HSVtk Gene Therapy", *Curr Pharm Des*, 8(16):1435-50, 2002.
- Vries *et al.*, "Positron emission tomography: measurement of transgene expression", *Methods*, 27(3):234, 2002.
- Soling *et al.*, "Intracellular localization of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase fused to different fluorescent proteins depends on choice of fluorescent tag", *FEBS Lett*, 527(1-3):153, 2002.
- 65

ES 2 741 523 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roizman, *et al.*

5 <120> DIRECCIÓN DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLE A RECEPTORES ESPECÍFICOS

<130> 27373/38819A

10 <150> US 60/416.716
<151> 07/10/2002

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.2

15 <210> 1
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador sintético

25 <400> 1
cattgctctc acttgccctg gcggctttgc ctcccaggc cctgtgcctc cctctacagc 60

<210> 2
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador sintético

35 <400> 2
gcagctagcc tcatggcgct ttgttgacc acggtcattg ctctcactg ccttggcggc 60

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador sintético

45 <400> 3
gagctcggat cctgaattca accgtccctc 30

<210> 4
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador sintético

55 <400> 4
gacacgggct accctacta tcgagggc 28

60 <210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Cebador sintético

ES 2 741 523 T3

	<400> 5 ggtgatgttc gtcaggacct cctctaggtc	30
5	<210> 6 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 6 gttcttcttc ggttcggat cccccg	26
15	<210> 7 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 7 cggcatttcc ggaataacgc ccactc	26
25	<210> 8 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 8 cagaaaaccg gatccccaa agccgcc	27
35	<210> 9 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 9 gccaacacaa actcgtcgta cgggtac	27
45	<210> 10 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 10 cagttatcct taaggtctct tttgtgtgt g	31
55	<210> 11 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador sintético	
65		

ES 2 741 523 T3

	<400> 11 ccggaattcc ggagatcttc cctcgaggac cggaaggtct ttgccgcaa ag	52
5	<210> 12 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 12 ccggaattcc ggggtaccct ggaccagctg accgaccctc cgg 43.	
15	<210> 13 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 13 cggggggatg cgcagcggga gggcgctact ac	32
30	<210> 14 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
35	<400> 14 ccgctcgaga tggcgctttt gttgaccag g	31
40	<210> 15 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
45	<400> 15 ggggtaccgt tgaaccgtcc ctgcgaaa	29
50	<210> 16 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
55	<400> 16 ccgctcgaga tggcgctttt gttgaccag g	31
60	<210> 17 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador sintético	

ES 2 741 523 T3

	<400> 17 ggggtaccgt tgaaccgtcc ctcgcgaaa	29
5	<210> 18 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 18 ccgctcgaga tggcgctttt gttgaccacg g	31
15	<210> 19 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 19 aactgcaggt tgtcggggg ggccggggg	29
30	<210> 20 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 20 aagattggg ctagcatggc ttcgttgc	30
40	<210> 21 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 21 tcctogaag ctcaagcat aatctggcac atcatatgta tcacagaaa a	51
50	<210> 22 <211> 568 <212> ADN <213> Virus del herpes simple	
	<400> 22	

ES 2 741 523 T3

gcttggtcgg gaggccgcat cgaacgcaca ccccatccg gtgggtccgtg tggaggctgt 60
 ttttcagtgc cgggtctcgc ttgcccggga acgctagcct catggcgctt ttgttgacca 120
 cggtcattgc tctcacttgc cttggcgggt ttgcctcccc aggccctgtg cctccctcta 180
 cagccctcag gtacctcatt gaggagctgg tcaacatcac ccagaaccag aaggctccgc 240
 tctgcaatgg cagcatggta tggagcatca acctgacagc tggcatgtac tgtgcagccc 300
 tggaatccct gatcaacgtg tcaggctgca gtgccatcga gaagaccagc aggatgctga 360
 gcggattctg cccgcacaag gtctcagctg ggcagttttc cagcttgcac gtccgagaca 420
 ccaaaaatcga ggtggcccag ttgtgaaaag atctgctctt acattttaaag aaactttttc 480
 gcgaggggacg gttgaattcc acccgcatgg agttccgcct ccagatatgg cgttactcca 540
 tgggtccgtc ccccccaatc gctccggc 568

5 <210> 23
 <211> 350
 <212> ADN
 <213> Virus del herpes simple
 <400> 23

gggtcctggt ggcgtcggcg gctccagatt cccccggcac gcctggggtc gcggccgcga 60
 cccagggcggc gaacggggga cctgccactc cggcgccgcc cgccccctggc cccgccccaa 120
 cgggggatcc gaaaccgaag aagaacagaa aaccgaaacc cccaaagcgc cgcgccccgc 180
 cggcgacaac gcgaccgtcg ccgcggggca cgccaccctg cgcgagcacc tgcgggacat 240
 caaggcggag aacaccgatg caaactttta cgtgtgcca cccccacgg gcgccacggt 300
 ggtgcagttc gagcagccgc gccgctgccc gaccggccc gagggtcaga 350

10
 15 <210> 24
 <211> 655
 <212> ADN
 <213> Virus del herpes simple
 <400> 24

ES 2 741 523 T3

atggggggggg ctgccgccag gttggggggcc gtgattttgt ttgtcgtcat agtcggcctc 60
catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg gatgcctctc tcaagctggc cgacccaat 120
cgctttcgcc gcaaagacct tccggtcctc gagatggcgc ttttgttgac cacggtcatt 180
gctctcactt gccttggcgg ctttgcctcc ccaggccctg tgctcccct ctacagccct 240
cagggagctc attgaggagc tggtaacat caccagaac cagaaggctc cgctctgcaa 300
tggcagcatg gtttggagca tcaacctgac agctggcatg tactgtgcag ccctggaatc 360
cctgatcaac gtgtcaggct gcagtgccat cgagaagacc cagaggatgc tgggcggatt 420
ctgcccgcac aaggtctcag ctgggcagtt ttccagcttg catgtccgag acacaaaat 480
cgaggtggcc cagtttgtaa aggacctgct cttacattta aagaaacttt ttcgcgaggg 540
acggttcaac tgaaacggta ccctggacca gctgaccgac cctccggggg tccggcgcgt 600
gtaccacatc caggcgggccc taccggaccc gttccagccc cccagcctcc cgatc 655

REIVINDICACIONES

1. Una partícula del virus del herpes simple (VHS) recombinante que tiene en su superficie:

- 5 (a) una proteína de la superficie vírica de VHS alterada que comprende una gB mutagenizada o una gC mutagenizada que impida la interacción con el sulfato de heparán, en la que la alteración reduce la unión de la proteína de la superficie vírica de VHS a un proteoglicano sulfatado, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al proteoglicano sulfatado de la proteína de superficie que no tiene la alteración;
- 10 (b) una gD alterada, en la que la alteración es una inserción de un ligando peptídico IL13 heterólogo que interrumpe el sitio de unión de gD para el HveA, reduciendo así la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares en comparación con una gD que no tiene la alteración; en la que el ligando peptídico heterólogo está en la superficie de la partícula de VHS recombinante y es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular, y en la que dicho ligando peptídico heterólogo está en forma de una proteína de fusión con dicha gD alterada,

15 en la que el ligando peptídico heterólogo es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular.

2. Un VHS recombinante que comprende:

- 20 (a) un primer gen que codifica una proteína de superficie vírica de VHS alterada que comprende una gB mutagenizada o una gC mutagenizada que impide la interacción con el sulfato de heparán, en la que la alteración reduce la unión de la proteína de la superficie vírica de VHS a un proteoglicano sulfatado, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al proteoglicano sulfatado de la proteína de superficie que no tiene la alteración; y

- 25 (b) un segundo gen que codifica una gD alterada, en la que la alteración es una inserción de un ligando peptídico IL13 heterólogo que interrumpe el sitio de unión de gD para el HveA, reduciendo así la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares en comparación con una gD que no tiene la alteración, en el que la región codificante del segundo gen que tiene la región codificante para el ligando superficial peptídico heterólogo insertada en el mismo codifica una proteína de fusión que comprende la gD alterada y el ligando superficial peptídico heterólogo,
- 30 y

en el que el ligando peptídico heterólogo es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular.

35 3. La partícula de VHS recombinante de la reivindicación 1 o el VHS recombinante de la reivindicación 2, que presentan afinidad específica por un componente de la superficie celular que no es un receptor vírico natural.

4. La partícula de VHS recombinante de la reivindicación 1 o el VHS recombinante de la reivindicación 2, en los que la proteína de la superficie vírica es gB.

40 5. La partícula de VHS recombinante de la reivindicación 1 o el VHS recombinante de la reivindicación 2, en los que la alteración de gD reduce la unión a HveA o HveC, y en los que dicha unión es reducida en comparación con la unión de gD que no tiene la alteración a HveA o HveC de gD.

45 6. La partícula de VHS recombinante de la reivindicación 1 o el VHS recombinante de la reivindicación 2, que comprenden además un ligando que está en forma de una proteína de fusión con una proteína de superficie vírica, preferentemente gC, en los que el ligando es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular.

50 7. La partícula de VHS recombinante de la reivindicación 1 o el VHS recombinante de la reivindicación 2, en los que la célula es una célula cancerosa, preferentemente, una célula tumoral o una célula de glioma maligna.

8. La partícula de VHS recombinante o el VHS recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como agente terapéutico.

55 9. La partícula de VHS recombinante o el VHS recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad tumorigénica.

60 10. Una partícula de VHS recombinante que comprende un ligando peptídico específico para un receptor de superficie celular, en la que el ligando peptídico está en forma de una proteína de fusión con una gD alterada, en la que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración, y en la que el ligando peptídico es IL13, y/o en la que la gD se altera mediante la inserción del ligando peptídico en el aminoácido 24, para su uso en un método para tratar una enfermedad tumorigénica.

65 11. La partícula de VHS recombinante para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además una proteína de la superficie vírica de VHS alterada que comprende una gB mutagenizada o una gC mutagenizada que

impide la interacción con el sulfato de heparán, en la que la alteración reduce la unión de la proteína de la superficie vírica de VHS a un proteoglicano sulfatado, en la que la unión es reducida en comparación con la unión al proteoglicano sulfatado de la proteína superficial que no tiene la alteración.

- 5 12. La partícula de VHS recombinante para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la alteración de gD reduce la unión a HveA o HveC, en la que la unión es reducida en comparación con la unión de la proteína a HveA o HveC de gD que no tiene la alteración.
- 10 13. La partícula de VHS recombinante para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además un ligando que está en forma de una proteína de fusión con gC, en la que el ligando es capaz de unirse a un receptor en una superficie celular.
14. Un método de obtención de imágenes de una célula que comprende:
- 15 (a) poner en contacto la célula con una partícula de VHS recombinante que comprende:
- (i) una gD alterada que comprende la inserción del ligando peptídico IL13 en gD interrumpiendo así el sitio de unión de gD para el HveA, en la que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares en comparación con la unión a uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración, en la que dicha gD alterada está en forma de una fusión con el ligando peptídico con un receptor específico de la célula; y
- 20 (ii) un gen que codifica una proteína marcadora; y
- (b) detectar la presencia de la proteína.
- 25 15. La partícula de VHS recombinante para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 o el método de la reivindicación 14, en los que la célula es una célula cancerosa, preferentemente, una célula tumoral o una célula de glioma maligna.
- 30 16. La partícula de VHS recombinante para el uso de acuerdo con la reivindicación 15 o el método de la reivindicación 15, en los que el receptor está presente en mayor número en la célula cancerosa en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo.
17. El método de la reivindicación 14, en el que la proteína marcadora es la timidina quinasa, proteína verde fluorescente, luciferasa o beta-galactosidasa.
- 35 18. Una partícula de VHS recombinante para su uso en un método para matar una célula diana, en el que dicha partícula de VHS comprende una gD alterada que comprende la inserción del ligando peptídico IL13 en gD, interrumpiendo así el sitio de unión de gD para el HveA, en la que la gD alterada se fusiona con el ligando peptídico IL13 a un receptor específico para dicha célula, en la que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares en comparación con la unión a uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración, y en la que dicha célula diana se pone en contacto con dicha partícula de VHS recombinante.
- 40 19. Un método para matar una célula diana *in vitro*, que comprende poner en contacto la célula diana con una partícula de VHS recombinante, en el que la partícula de VHS comprende una gD alterada que comprende la inserción del ligando peptídico IL13 en gD, interrumpiendo así el sitio de unión de gD para el HveA, en la que la gD alterada se fusiona con el ligando peptídico IL13 a un receptor específico de la célula, y en la que la alteración reduce la unión de gD a uno o más de sus receptores celulares en comparación con la unión a uno o más receptores celulares de gD que no tiene la alteración.
- 45 50

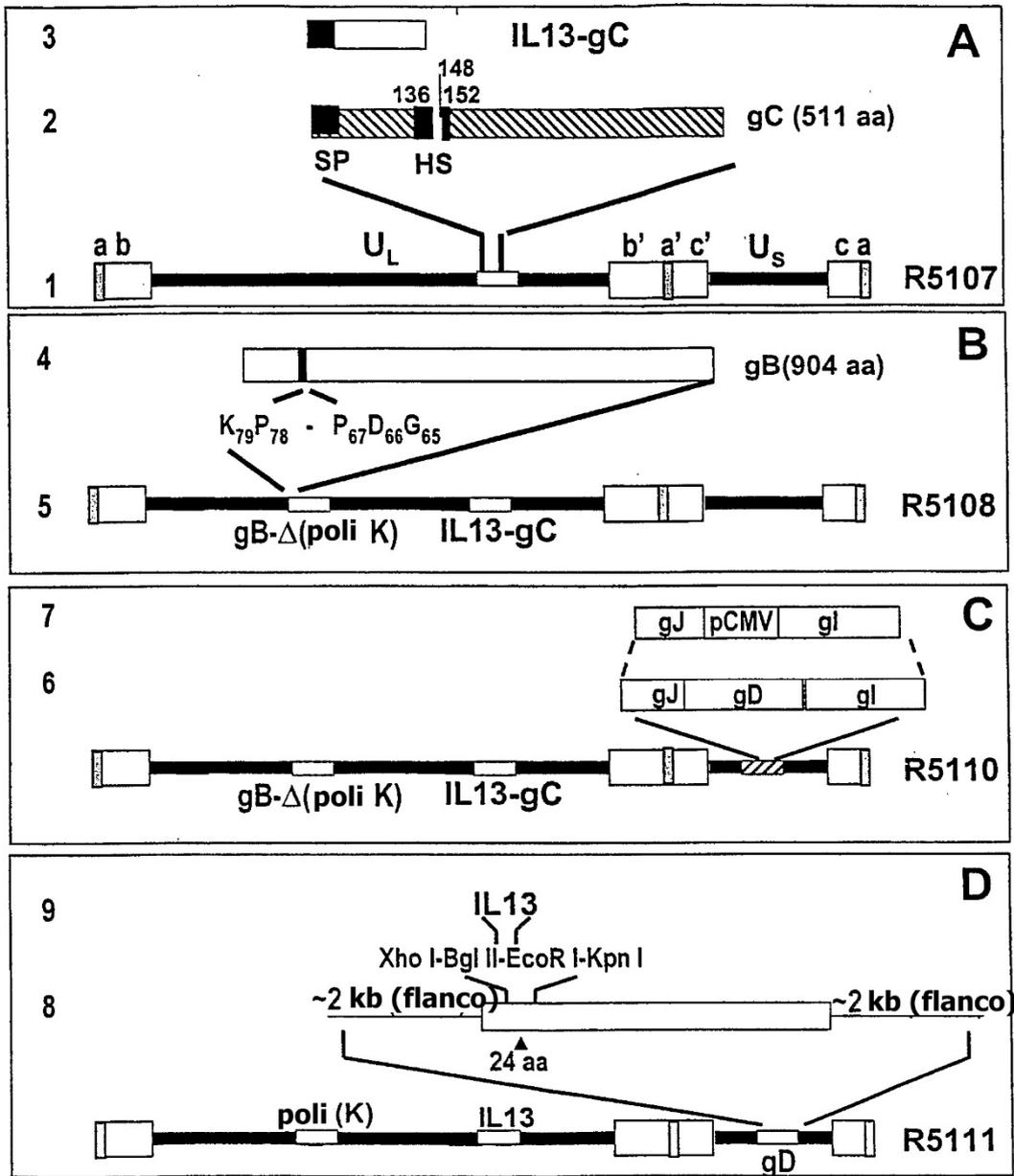


FIGURA 1

A. La secuencia amino-terminal de IL13-gC

gcttggtcgggagggccgcatcgaacgcacacccccatccggtggtccggtggtggaggtcggtttttcagtgcc
 cggctcgcgtttgcccgggaacgctagcctcATGGCGCTTTTGTGACCACGGTCATTGCTCTCACTTGCCT
 gC dirección 5' ← → IL-13*
 TGGCGGCTTTGCCTCCCCAGGCCCTGTGCCCTCCCTCTACAGCCCTCAGGTAGCTCATTGAGGAGCTGGTCA
 ACATCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTATGGAGCATCAACCTGACAGCTGGC
 ATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCCCTGATCAACGTGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGAT
 GCTGAGCGGATTCGCCCCGACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCAATGTCCGAGACACCAAAA
 TCGAGGTGGCCAGTTTTGTAAAGATCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTTCGGGAGGGACGGTTgaa
 tgcACCCCGCATGGAGTTCGCCCTCCAGATATGGCGTTACTCCATGGGTCCGTCCCCCAATCGCTCCGGC
 → gc dirección 3'

B. La secuencia del dominio gBΔpoli(K)

GGGTCCCTGGTGGCGTCCGGCGGCTCCGAGTTCccccggcACGCCTGGGGTCCGGCCCGGACCCAGGC
 GAACGGGGGACCTGCCACTCCGGCGCCGCCGCCCTGGCCCCGCCCAACGGGGGATCCGAAACCGAAG
 AAGAACAGAAACCGAAACCCCAAAGCGCCCGCCCCCGGGGACAAACCGGACCCGTCGCCCGGGCCA
 CGCCACCCTGCGCGAGCACCTGCGGGACATCAAGCGGGAGAACCCGATGCAAACCTTTAGGTGTGCCCA
 CCCCCACGGGCGCCACGGTGGTGCAGTTCGAGCAGCCGCGCCGCTGCCCGACCCGGCCCCGAGGGTCAGA

C. La secuencia amino-terminal de IL13-gD

ATGGGGGGGCTGCCGCCAGGTTGGGGCCGTGATTTTGTGTTGTCGTCATAGTCGGCCTC
 péptido señal de gD →
CATGGGGTCCGCGGCAAAATATGCCTTGGCGGATGCCTCTCTCAAGCTGGCCGACCCCAAT
 ←
 CGCTTTCGCCGCAAAGACCTTCCGGTCCctegag*ATGGCGCTTTTGTGTTGACCACGGTCATT
 24AA XhoI IL13 →
 GCTCTCACTTGCCTTGGCGGCTTTGCCCTCCCCAGGCCCTGTGCCCTCCCTCTACAGCCCTC
 AGGGAGCTCATTGAGGAGCTGGTCAACATCACCCAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAAT
 GGCAGCATGGTTTGGAGCATCAACCTGACAGCTGGCATGTACTGTGCAGCCCTGGAATCC
 CTGATCAACGTGTGTCAGGCTGCAGTGCCATCGAGAAGACCCAGAGGATGCTGGGCGGATTC
 TGCCCGCACAAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTCCAGCTTGCAATGTCCGAGACACCAAAATC
 GAGGTGGCCAGTTTTGTAAAGGACCTGCTCTTACATTTAAAGAACTTTTTTCGGGAGGGA
 CGGTTCAACTGAAAC*ggtaaccCTGGACCAGCTGACCCGACCCTCCGGGGGTCCGGCGCGCTG
 ←IL13 KpnI 25AA
 TACCACATCCAGGCGGGCCTACCGGACCCGTTCCAGCCCCCAGCCTCCCGATC

FIGURA 2

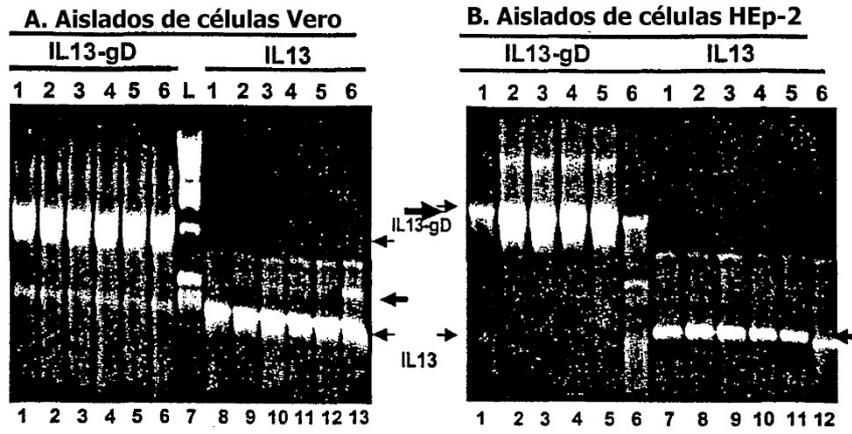


FIGURA 3

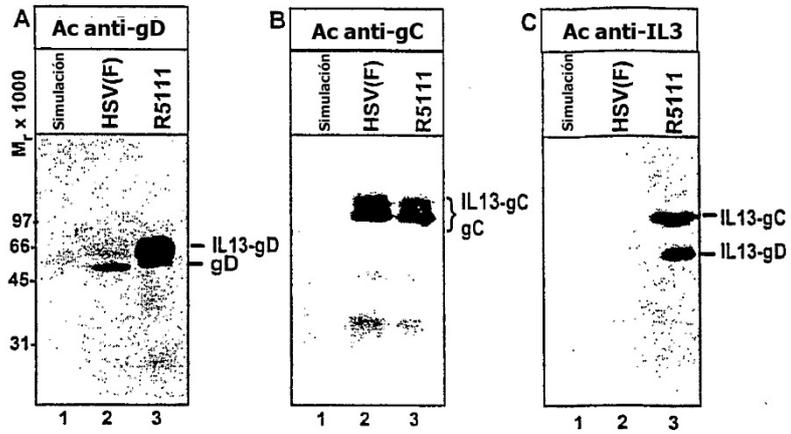


FIGURA 4

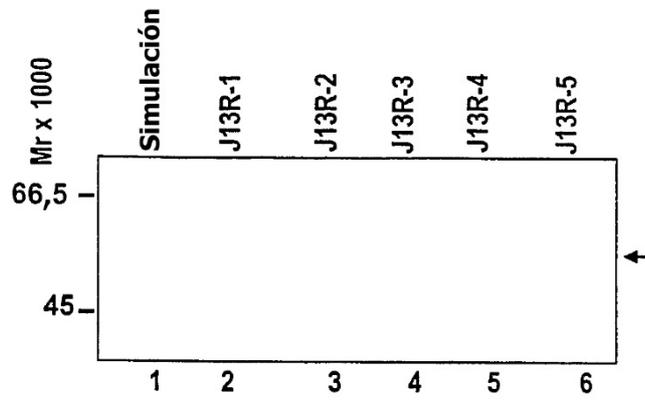


FIGURA 5

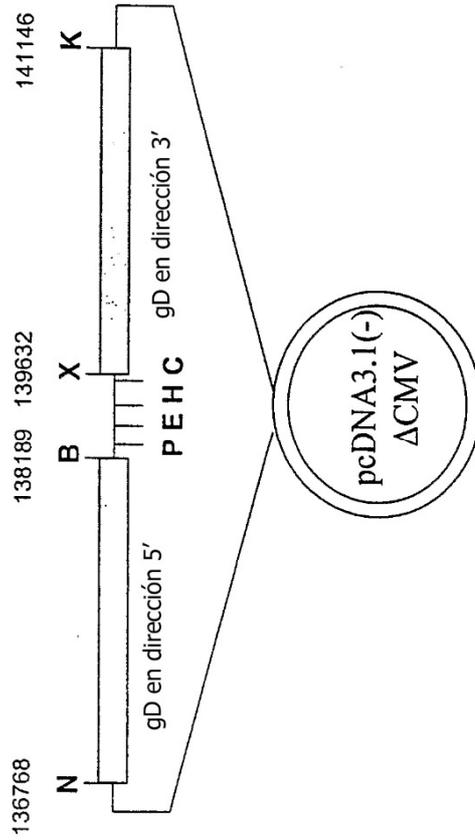


FIGURA 6

pgD- en pcDNA3.1(-) con promotor de CMV destruido por la digestión con NruI/NheI. El fragmento que contiene gD en dirección 5' en NotI/BamHI y gD en dirección 3' en XhoI/KpnI en pBluescript II SK fue escindido por NotI/KpnI ligadas en pcDNA3.1(-) en el que se había destruido el promotor de CMV. N, NotI, B, BamHI, P, PstI, E, EcoRI, H, HindIII, C, ClaI, X, XhoI y K, KpnI.