



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 756**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/44** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96937833 .0**

86 Fecha de presentación : **31.10.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0858346**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.08.1998**

54

Título: **Expresión de ciclina G1 en tumores.**

30

Prioridad: **01.11.1995 US 551486**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.01.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.01.2008**

73

Titular/es: **University of Southern California  
University Park  
Los Angeles, California 90089, US**

72

Inventor/es: **Gordon, Erlinda, M.;  
Hall, Frederick, L. y  
Anderson, W., French**

74

Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 288 756 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

Expresión de ciclina G1 en tumores.

5 Esta invención se refiere a la expresión de ciclina G1 en tumores. Más particularmente, esta invención se refiere a: (i) el tratamiento de tumores tales como sarcoma osteogénico o sarcoma de Ewing, inhibiendo la proteína ciclina G1 en las células tumorales; (ii) la prevención de reestenosis inhibiendo la proteína ciclina G1 en las células en el sitio de un procedimiento vascular invasivo o lesión vascular; (iii) la inmortalización de células transduciendo tales células con un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1; (iv) haciendo que las células sean más receptivas a infección o transducción mediante un vector retroviral transfectando las células con un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, anteriormente o al mismo tiempo, que dicha transducción o infección retroviral; y (v) un método *in-vitro* para detectar cáncer determinando el nivel de expresión de la proteína ciclina G1 en células. Esta invención también se refiere a vehículos de expresión, preferiblemente vectores retrovirales y vectores adenovirales, que incluyen polinucleótidos que codifican agentes que inhiben la proteína ciclina G1, tales como polinucleótidos antisentido, y anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que reconocen la proteína ciclina G1, y a vehículos de expresión que incluyen un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1.

## Antecedentes de la invención

20 Los genes que codifican una nueva clase de proteínas conocidas como ciclinas se han identificado como una nueva clase de protooncogenes, y los inhibidores de quinasa dependiente de ciclina (o Cdk) se han identificado como supresores tumorales, uniendo de este modo los mecanismos moleculares de transformación celular y tumorigénesis con la enzimología que gobierna el control del ciclo celular. (Hall, *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol. 3, págs. 176-184 (1991); Hunter, *et al.*, *Cell*, Vol. 55, págs. 1071-1074 (1991); Hunter, *et al.*, *Cell*, Vol. 79, págs. 573-582 (1994); Elledge, *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol. 6, págs. 874-878 (1994); Peter, *et al.*, *Cell*, Vol. 79, págs. 181-184 (1994)). La expresión secuencial de ciclinas específicas y las funciones esenciales de complejos de Cdk específicos se han definido (Wu, *et al.*, *Int. J. Oncol.*, Vol. 3, págs. 859-867 (1993); Pines, *et al.*, *New Biologist*, Vol. 2, págs. 389-401 (1990); Pines, *Cell Growth and Differentiation*, Vol. 2, págs. 305-310 (1991); Reed, *Ann. Rev. Cell Biol.*, Vol. 8, págs. 529-561 (1992); Sherr, *Cell*, Vol. 79, págs. 551-555 (1994)), proporcionado por tanto conexiones directas con los mecanismos fundamentales de la replicación, transcripción, reparación, inestabilidad genética del ADN, y la apoptosis. (D'Urso, *et al.*, *Science*, Vol. 250, págs. 786-791 (1990); Wu, *et al.*, *Oncogene*, Vol. 9, págs. 2089-2096 (1994); Roy, *Cell*, Vol. 79, págs. 1093-1101 (1994); Meikrantz, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 91, págs. 3754-3758 (1994)). El inhibidor de Cdk universal p21/WAF1/CIP1 (Xiong, *et al.*, *Nature*, Vol. 366, págs. 701-704 (1993); Harper, *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, Vol. 6, págs. 387-400 (1995)), y la ciclina G1 (Wu, *et al.*, *Oncol. Reports*, Vol. 1, págs., 705-711 (1994)) se inducen por la proteína supresora de tumores p53 de tipo silvestre en el inicio de la reparación del ADN y/o apoptosis. (El-Deiry, *et al.*, *Cell*, Vol. 75, págs. 817-825 (1993); El-Deiry, *et al.*, *Cancer Res.*, Vol. 54, págs. 1169-1174 (1994)). Por tanto, los componentes moleculares que regulan puntos de control del ciclo celular críticos representan dianas estratégicas para potencial intervención terapéutica en el tratamiento de trastornos de proliferación celular, incluyendo cánceres óseos pediátricos, en los que los genes supresores de tumor Rb y p53 a menudo están inactivados. (Hansen, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 82, págs. 6216-6220 (1985); Toguchida, *et al.*, *Nature*, Vol. 338, págs. 156-158 (1989); Toguchida, *et al.*, *Cancer Res.*, Vol. 48, págs. 3939-3943 (1988); Diller, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 10, págs. 5772-5781 (1990)). Estudios previos han caracterizado el perfil progresivo de la expresión de ciclina y activación de Cdk (Wu, 1993; Carbonaro-Hall, *et al.*, *Oncogene*, Vol. 8, págs. 1649-1659 (1993); Hall, *et al.*, *Oncogene*, Vol. 8, págs. 1377-1384 (1993); Williams, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, págs. 8871-8880 (1993); Albers, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, págs. 22825-22829 (1993)), así como la inducción independiente de p53 de p21/WAF1/CIP1 (Wu, *et al.*, *Oncol. Reports*, Vol. 2, págs. 227-231 (1995)), en células de osteosarcoma MG-63. Además, las estrategias de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra ciclina D1 inhiben de forma eficaz la progresión del ciclo celular en estas células de osteosarcoma. (Wu, 1993).

50 El carcinoma metastásico es una diana importante para terapia génica, ya se asocia a evolución mala. El cáncer colorrectal, por ejemplo, es la segunda causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos después del cáncer pulmonar, seguido de cáncer de mama y pancreático (Silberberg *et al.*, *Cancer Clin.*, Vol. 40, págs. 9-26 (1990)). De estos carcinomas, el cáncer pancreático tiene el peor pronóstico. La supervivencia media de pacientes con cáncer pancreático metastásico es de entre tres y seis meses y prácticamente todos los pacientes mueren en el intervalo de un año (Merrick *et al.*, *Gastroenterol. Clin. N. Amer.*, Vol. 19, págs. 935-962 (1990)). Aproximadamente el 40% de los pacientes tendrán enfermedad metastásica en el hígado o la cavidad peritoneal o ambos en el momento del diagnóstico. La quimioterapia para la enfermedad metastásica es ineficaz a pesar de la terapia multimodal. Por lo tanto, son deseables enfoques alternativos para el carcinoma metastásico.

60 Wu, *et al.*, (*Oncol. Reports*, Vol. 1, págs. 705-711 (1994)), que se ha mencionado anteriormente en este documento, describe la secuencia aminoacídica deducida y la secuencia de ADNc de la proteína ciclina G1 humana. Wu, *et al.* también describen que se observaron niveles más elevados de expresión de ciclina G1 en células de osteosarcoma y en células de sarcoma de Ewing que en fibroblastos diploides humanos normales. A pesar de que Wu, *et al.*, afirman que la sobreexpresión de proteína ciclina G1 en células humanas de osteosarcoma proporciona una conexión potencial a cáncer, Wu, *et al.*, no describen el tratamiento de cáncer mediante interferencia con o inhibiendo la función de la proteína ciclina G1 en células cancerosas.

## ES 2 288 756 T3

Okamoto *et al.* (The EMBO Journal, Vol. 13, N° 19, págs. 4816-4822, 1994) describen que la ciclina G es una diana transcripcional de la proteína supresora de tumor p53.

5 Tamura *et al.* (ONCOGENE, Vol. 8, págs. 2113-2118, 1993) describen que la ciclina G es una nueva ciclina de mamífero con homología con la levadura de fisión Cig1.

### Sumario de la invención

10 Los solicitantes han descubierto que interfiriendo con y/o inhibiendo la función o expresión de la proteína ciclina G1 en células cancerosas, se puede inhibir, evitar o destruir el crecimiento y/o supervivencia de tales células cancerosas. Por tanto, la presente invención está implicada en el tratamiento de un tumor (preferiblemente un tumor canceroso) inhibiendo la proteína ciclina G1 mediante la administración de oligonucleótidos antisentido a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, o anticuerpos de la proteína ciclina G1.

15 Además, la presente invención se dirige a (i) la prevención de reestenosis inhibiendo la proteína ciclina G1 en las células en el sitio de un procedimiento vascular invasivo o lesión vascular; (ii) la inmortalización de células transduciendo las células con un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1; (iii) la transducción de células con un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 para hacer que las células sean más receptivas a la transducción o infección con un vector retroviral; y (iv) un ensayo de cáncer que implica la detección de una proteína ciclina G1 y/o  
20 un polinucleótido que codifica tal proteína.

La presente invención también se dirige a los vehículos de expresión que incluyen polinucleótidos que codifican agentes que inhiben la proteína ciclina G1, y a vehículos de expresión que incluyen un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1. Tales vehículos de expresión incluyen, pero sin limitación, vectores virales tales como vectores  
25 retrovirales y vectores adenovirales.

### Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá respecto a los dibujos, en los que:

30 La Figura 1 es una secuencia nucleotídica ADNc de ciclina G1 humana;

La Figura 2 ilustra la tinción de células de sarcoma osteogénico MG-63 después de la transducción de tales células con un vector retroviral que incluye una B-galactosidasa, o gen lacZ;

35 La Figura 3 es un gráfico de los grados de confluencia (%) en mezclas de células MG-63 que se han transducido con un vector retroviral que incluye un gen de timidinquinasa (TK) del virus del Herpes Simplex, y células que no se han transducido con tal vector;

40 La Figura 4 es un esquema de los vectores retrovirales G1aD1SvNa, G1aG1SvNa, G1p21SvNa, y G1XSvNa;

La Figura 5 es un gráfico de los recuentos celulares en cultivos de células MG-63 transducidas con G1XSvNa, G1aD1SvNa, G1aG1SvNa, o G1p21SvNa;

45 La Figura 6 es una Transferencia de Western de la expresión de proteína ciclina G1 p29 en células MG-63 transducidas con G1XSvNa, G1aG1SvNa, o G1aD1SvNa;

La Figura 7 ilustra el aspecto morfológico de células MG-63 mediante microscopía óptica 72 horas después de la transducción de tales células con G1XSvNa, G1aG1SvNa, G1aD1SvNa, o G1p21SvNa;

50 La Figura 8 ilustra la detección de células apoptóticas en cultivos de células MG-63 transducidas con G1XSvNa, G1aG1SvNa, G1aD1SvNa, o G1p21SvNa;

55 La Figura 9A ilustra el análisis FACS de núcleos teñidos con PI 48 horas después de la transducción de células de carcinoma VX2 con un vector retroviral que lleva ciclina G1 antisentido (G1aG1SvNa), en comparación con los del vector control (G1XSvNa).

60 La Figura 9B ilustra el análisis FACS de núcleos teñidos con PI 48 horas después de transducción de células de osteosarcoma MG-63 con vectores retrovirales que llevan ciclina G1 antisentido (G1aG1SvNa) en comparación con el vector control (G1XSvNa).

Figura 10: efectos citostáticos de vectores retrovirales que llevan ciclina G1 antisentido y p53 de tipo silvestre en células de carcinoma indiferenciadas VX2 transducidas. Se midieron las densidades celulares, mediante recuento celular, en cultivos celulares de células VX2 en intervalos seriados después de la transducción con vector retroviral antes de la selección por G418.

65 Figura 11: aspecto morfológico de células VX2 10 días después de la transducción con vectores retrovirales que llevan ciclina G1 antisentido (G1aG1SvNa), p53 de tipo silvestre (G1p53SvNa) o el vector control (G1XSvNa) después de la selección por G418.

Figura 12: inhibición del crecimiento tumoral VX2 en ratones desnudos después de inyección intratumoral de vector retroviral que lleva ciclina G1 antisentido. El porcentaje de aumento del tamaño tumoral, representado en el eje vertical, se expresa como una función del tiempo (días), representado en el eje horizontal.

5 Figura 13A: aspecto general de ratones que llevan tumor VX2 representativo una semana después del tratamiento con vectores retrovirales que llevan ciclina G1 antisentido (G1aG1SvNa) o el vector control (G1XSvNa).

Figura 13B: tinción hematoxilina-eosina de secciones de tumor fijadas en formalina una semana después del tratamiento con vectores retrovirales que llevan ciclina G1 antisentido (G1aG1SvNa) o el vector control (G1XSvNa).  
10 Aumento 40X.

La Figura 14 es un gráfico de tamaños tumorales en ratones inyectados con células MNNG/HOS, seguido de inyección de los vectores retrovirales G1XSvNa o G1aG1SvNa. Los volúmenes tumorales se miden 0, 4, 6, 8, 10 y 12 días después de la inyección de los vectores retrovirales.

15 Figura 15: (A) células de músculo liso aórtico que expresan  $\beta$ -galactosidasa dirigida a núcleo (células con núcleos azules) después de la transducción con el vector G1nBgSvNa; (B) efectos citostáticos y citocidas de ciclina G1 antisentido y p53 de tipo silvestre en SMC aórticas transducidas. Se midieron las densidades celulares mediante recuento celular directo en cultivos de SMC aórticas recogidas a intervalos seriados después de la transducción con vectores retrovirales que llevan G1 antisentido (G1aG1SvNa) y p53 de tipo silvestre (G1p53SvNa), así como el vector control (G1XSvNa); (C) incorporación de timidina- $H^3$  en SMC aórticas cultivadas después de la transducción con vectores retrovirales (n = 3 cada grupo). La radioactividad se expresa como dpm por pocillo. Los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  1 desviación típica;

25 Figura 16: el aspecto morfológico de SMC aórticas, observadas mediante microscopía óptica 24 horas después de la transducción con vectores retrovirales control y de ciclina G1 antisentido (A = vector control G1XSvNa; B-D = G1aG1SvNa). Detección de apoptosis en SMC vasculares después de la transducción con vector retroviral de ciclina G1 antisentido; (E) células transducidas con el vector control G1XSvNa, (F) células transducidas con el vector de ciclina G1 antisentido G1aG1SvNa. Los cuerpos apoptóticos de tinción oscura se observan en el interior y en el exterior de las células sincitiales;

Figura 17: efecto “testigos” citocida en SMC aórticas transducidas con vector de ciclina G1 antisentido. Incorporación de SMC aórticas no transducidas marcadas de forma fluorescente en sincitios multicelulares cuando se superponen sobre un cultivo de SMC transducido previamente con un vector de ciclina G1 antisentido. A y B, bajo aumento; C y D, gran aumento; A y C, contraste de fase; B y D, luz UV. Un sincitio multinuclear representativo que incorpora células que contienen la marca fluorescente se identifica mediante la flecha. (E) Cuantificación de la formación de sincitios durante el tiempo en SMC vasculares transducidas con vectores retrovirales: G1XSvNa, vector control; G1aG1SvNa, vector que lleva el gen de ciclina G1 antisentido; G1p53SvNa, vector que lleva p53 de tipo silvestre.

40 Figura 18: (A) cultivos de alta densidad de SMC aórticas raspadas con una punta de pipeta de 200  $\mu$ l para crear un tramo de 1 mm desprovisto de células, (B) El aspecto del margen “herido” inmediatamente después del raspado y lavado para retirar las células desprendidas, (C) SMC aórticas que expresan B-galactosidasa dirigida a núcleo a lo largo de los márgenes del tramo, (D) Proliferación y migración de SMC aórticas transducidas con el vector control G1XSvNa al interior del tramo 24 horas después de la lesión, (E) cambios apoptóticos y degenerativos en SMC aórticas transducidas con el vector G1aG1SvNa con marcada formación de sincitios; y

Figura 19: ensayo de la eficacia de un vector de ciclina G1 antisentido en el modelo de reestenosis de lesión de la arteria carótida de rata. La capa de elastina de la túnica media se identifica (en A-D) mediante tinción de Verhoeff. La neoíntima, comprendida de células de músculo liso en proliferación (células que se tiñen de amarillo rojizo), se identifican mediante tinción rojo Siris. A y C = segmentos arteriales no creados; B y D = segmentos arteriales tratados con vector de ciclina G1 antisentido. E y F = mayor aumento de segmentos arteriales no tratados y tratados con aG1, respectivamente, G = Análisis de las proporciones de neoíntima a media de segmentos arteriales no tratados (NT), control (GIX) y ciclina G1 antisentido (aG1) se representan como barras verticales.

## 55 Descripción detallada de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un agente que inhibe la proteína ciclina G1 para preparar una composición farmacéutica para su uso en un método para tratar un tumor en un hospedador. El método comprende administrar a un hospedador o al tumor un agente que inhibe la proteína ciclina G1. El agente se administra en una cantidad eficaz para inhibir la proteína ciclina G1 en las células tumorales.

La expresión “tratar un tumor” como se usa en este documento significa que se proporciona la inhibición, prevención, o destrucción del crecimiento de las células tumorales.

65 La expresión “inhibir proteína ciclina G1” como se usa en este documento, significa que el agente inhibe o evita la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, o inhibe o evita la función de la proteína ciclina G1.

Los agentes que inhiben la proteína ciclina G1 son oligonucleótidos o fragmentos polinucleotídicos o secuencias que son complementarias al menos a una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 y que se unen a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 para evitar la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, y anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que reconocen la proteína ciclina G1.

En una realización, el agente que inhibe la proteína ciclina G1 es un polinucleótido antisentido que es complementario a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1. Un ADNc de nucleótido (Figura 1) y secuencia aminoacídica deducida de la proteína ciclina G1 humana se describe en Wu, *et al.*, *Oncology Reports*, Vol. 1, págs. 705-711 (1994) que se incorpora en este documento como referencia.

El término "polinucleótido" se usa en este documento significa una forma polimérica de un nucleótido de cualquier longitud, e incluye ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Tal término también incluye ADN de hebra única o doble, así como ARN de hebra única o doble. El término también incluye polinucleótidos modificados tales como polinucleótidos metilados o protegidos.

En general, el polinucleótido antisentido que es complementario al menos a una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 incluye al menos 15 nucleótidos, preferiblemente al menos 18 nucleótidos, y más preferiblemente de 18 a 20 nucleótidos. En una realización, el polinucleótido antisentido es complementario a toda la longitud del polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1.

En una realización, el polinucleótido antisentido es complementario a, y por lo tanto, capaz de unirse a o hibridar con, al menos una parte de ARNm que codifica la proteína ciclina G1, inhibiendo por lo tanto la transducción de tal ARNm. En otra realización, el polinucleótido antisentido es complementario a, y por tanto, capaz de unirse a o hibridar con, ADN de hélice única o doble que codifica la proteína ciclina G1, evitando por lo tanto la transcripción de tal ADN a ARNm o inhibiendo la replicación de tal ADN. El polinucleótido antisentido se puede unir a cualquier parte del ADN o ARNm que codifica la proteína ciclina G1, pero preferiblemente, tal polinucleótido antisentido se une al extremo 5' del ADN o ARNm.

En otra realización, el polinucleótido antisentido puede ser una ribozima que promueva la escisión del ARNm que codifica la ciclina G1. Como se usa en este documento, el término "ribozima" significa cualquier hebra única de polinucleótido que forma una estructura secundaria que promueva la escisión catalítica de una molécula de ARNm diana una vez que se haya conseguido el reconocimiento basado en la secuencia específica del ARNm diana.

El oligonucleótido antisentido se puede sintetizar de acuerdo con técnicas conocidas por los especialistas en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante un sintetizador de oligonucleótidos automático. Después, el oligonucleótido antisentido se administra a un hospedador en una cantidad eficaz para inhibir la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 en células tumorales de un hospedador. El oligonucleótido antisentido se puede administrar en una cantidad de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ , preferiblemente de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 0,5  $\mu\text{M}$ . El hospedador puede ser un hospedador animal, y en particular, un hospedador mamífero, incluyendo hospedadores primates humanos y no humanos. El oligonucleótido antisentido se administra en general al hospedador por vía sistémica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica. Alternativamente, los oligonucleótidos antisentido pueden estar contenidos en liposomas, que se administran al hospedador por vía sistémica junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal administración sistémica puede ser, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraarterial, o intraperitoneal. Alternativamente, el oligonucleótido antisentido se puede administrar directamente al tumor.

Los oligonucleótidos antisentido se pueden modificar para estabilizar el oligonucleótido contra degradación por nucleasas y/o para potenciar la capacidad del oligonucleótido antisentido para penetrar en las células tumorales. Tal modificación se puede conseguir sustituyendo al menos uno de los enlaces fosfodiéster del oligonucleótido antisentido por una estructura que proporcione una estabilización aumentada del oligonucleótido antisentido contra degradación por nucleasas y/o potencia la capacidad del oligonucleótido antisentido para penetrar en las células tumorales. Tales sustituciones pueden incluir enlaces fosforotioatos y forforoditioatos, fosfotriésteres, enlaces alquil o aril fosfonato, tales como enlaces metilfosfonatos, estructuras de cadena corta alquilo o cicloalquilo o estructuras de cadena corta heteroatómicas o heterocíclicas, tales como, por ejemplo,  $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ , y  $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$ , así como estructuras morfolino. Se describen ejemplos de tales modificaciones en la solicitud PCT N° WO93/05182, publicada el 18 de marzo de 1993, y en la Patente de Estados Unidos N° 5.034.506, presentada el 23 de Julio de 1991. También se describen ejemplos de enlaces alquil o aril fosfonato en las Patentes de Estados Unidos N° 4.469.863 y 4.511.713. Alternativamente, al menos un nucleótido del oligonucleótido antisentido se puede conjugar con un resto que puede ser un aminoácido; una imitación de dipéptido, un azúcar; un fosfato de azúcar; un neurotransmisor; un polímero hidrófilo tal como polihidroxipropilmetacrilamida, dextranos, anhídrido polimaléico, una ciclodextrina, un almidón, o polietilenimina. Se describen ejemplos de tales restos en la Solicitud PCT N° WO94/01448, publicada el 20 de Enero de 1994. Ejemplos adicionales de restos que se pueden emplear para la modificación del oligonucleótido antisentido incluyen, pero sin limitación, alquil o arilfosforatos, carbamatos, sulfamatos, y (tio)formacetal.

Las anteriores modificaciones se pueden hacer en el oligonucleótido antisentido durante la síntesis del oligonucleótido antisentido mediante medios conocidos por los especialistas en la técnica. En una realización preferida, cuando el oligonucleótido antisentido se administra directamente o en un liposoma, el oligonucleótido antisentido incluye al me-

nos un resto de unión de fosforotioato o fosforoditioato, que se puede unir a la estructura general del oligonucleótido antisentido durante la síntesis mediante técnicas conocidas por los especialistas en la técnica.

5 En otra realización, el oligonucleótido antisentido se administra al hospedador transduciendo las células tumorales del hospedador con un polinucleótido que codifica un polinucleótido antisentido que es complementario a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1.

10 El polinucleótido que codifica un polinucleótido antisentido que es complementario a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 puede estar contenido en un vehículo de expresión apropiado que se transduce al interior de la célula tumoral. Tales vehículos de expresión incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores eucariotas, vectores procariotas (tales como, por ejemplo, vectores bacterianos) y vectores virales.

15 En una realización, el vector es un vector viral. Los vectores virales que se pueden emplear incluyen vectores de virus ARN (tales como vectores retrovirales) y vectores de virus ADN (tales como vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores de Herpes Virus, y vectores de virus vaccinia). Cuando se emplea un vector de virus ARN, al construir el vector, de polinucleótido que codifica el polinucleótido antisentido está en la forma de ARN. Cuando se emplea un vector de virus ADN, al construir el vector, el polinucleótido que codifica el polinucleótido antisentido está en la forma de ADN.

20 En una realización, el vector viral es un vector retroviral. Los ejemplos de vectores retrovirales que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, el Virus de la Leucemia Murina de Moloney, virus de la necrosis esplénica, y vectores derivados de retrovirus, tales como virus del Sarcoma de Rous, Virus del Sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de inmunodeficiencia humana, virus del sarcoma mieloproliferativo, y virus de tumor mamario. El vector generalmente es una partícula de retrovirus incapaz de replicación.

25 Los vectores retrovirales son útiles como agentes para mediar en la transferencia de genes mediada por retrovirus al interior de células eucariotas. Los vectores retrovirales se construyen generalmente de tal modo que la mayoría de las secuencias que codifican los genes estructurales del virus se elimina y se sustituye por el gen o los genes de interés. La mayoría de las veces, los genes estructurales (es decir, gag, pol y env), se retiran de la estructura del retrovirus usando técnicas de ingeniería genética conocidas en la técnica. Esto puede incluir digestión con la endonucleasa de restricción apropiada, o, en algunos casos, con exonucleasa Bal 31B para generar fragmentos que contienen partes apropiadas de la señal de empaquetamiento.

30 Estos nuevos genes se han incorporado a la estructura proviral de varios modos generales. Las construcciones más avanzadas son aquellas en las que los genes estructurales de los retrovirus se sustituyen por un único gen que después se transcribe bajo el control de las secuencias de regulación virales en la repetición terminal larga (LTR). También se han construido vectores retrovirales que pueden introducir más de un gen en células diana. Habitualmente, en tales vectores, un gen está bajo el control regulador de la LTR viral, mientras que el segundo gen se expresa mediante un mensaje de empalme o está bajo la regulación de su propio promotor interno. Alternativamente, se pueden expresar dos genes por un único promotor mediante el uso de un Sitio Interno de Entrada al Ribosoma.

35 Se han dirigido los esfuerzos para minimizar el componente viral de la estructura viral, en gran parte en un esfuerzo para reducir la probabilidad de recombinación entre el vector y el virus auxiliar carente de empaquetamiento en células de empaquetamiento. Se necesita un virus auxiliar defectuoso en empaquetamiento para proporcionar los genes estructurales de un retrovirus, que se han eliminado del propio vector.

40 Los ejemplos de vectores retrovirales que se pueden emplear incluyen vectores retrovirales generados a partir de vectores de plásmidos retrovirales derivados de retrovirus incluyendo, sin limitación, vectores del Virus de la Leucemia Murina de Moloney, tales como aquellos descritos en Millar, *et al.*, *Biotechniques*, Vol. 7, págs. 980-990 (1989), y en Miller, *et al.*, *Human Gene Therapy*, Vol. 1, págs. 5-14 (1990).

45 En una realización preferida, el vector de plásmido retroviral puede incluir al menos cuatro sitios de clonación o de reconocimiento de enzimas de restricción, donde al menos dos de los sitios tienen una frecuencia media de aparición en genes eucariotas de menos de una vez en 10.000 pares de bases; *es decir*, el producto de restricción tiene un tamaño de ADN medio de al menos 10.000 pares de bases. Los sitios de clonación preferidos se seleccionan del grupo compuesto por NotI, SnaBI, SalI, y XhoI. En una realización preferida, el vector de plásmido de retroviral incluye cada uno de estos sitios de clonación. Tales vectores se describen adicionalmente en la publicación de Patente de Estados Unidos N° 5.672.510 (N° Serie 08/340.805), presentada el 17 de noviembre de 1994, y en la Solicitud PCT N° W091/10728, publicada el 25 de julio de 1991.

50 Cuando se emplea un vector de plásmido retroviral que incluye tales sitios de clonación, también se puede proporcionar un vector lanzadera de clonación que incluye al menos dos sitios de clonación que son compatibles con al menos dos sitios de clonación seleccionados del grupo compuesto por NotI, SnaBI, SalI y XhoI localizados en el vector retroviral. El vector lanzadera de clonación también incluye al menos un gen deseado que es capaz de ser transferido desde el vector lanzadera de clonación al vector retroviral.

55 El vector lanzadera de clonación se puede construir a partir de un vector o fragmento "estructura" básico al que se unen uno o más enlazadores que incluyen sitios de clonación o de reconocimiento de enzimas de restricción. Los sitios

## ES 2 288 756 T3

de clonación compatibles o complementarios que se han descrito anteriormente en este documento, se incluyen en los sitios de clonación. Los genes y/o promotores que tienen extremos que se corresponden con los sitios de restricción del vector lanzadera se pueden unir al vector lanzadera mediante técnicas conocidas en la técnica.

5 El vector lanzadera de clonación se puede emplear para amplificar secuencias de ADN en sistemas procariotas. El vector lanzadera de clonación se puede preparar a partir de plásmidos usados generalmente en sistemas procariotas y en particular en bacterias. Por tanto, por ejemplo, el vector lanzadera de clonación se puede obtener de plásmidos tales como pBR322; pUC 18; etc.

10 El vector de plásmido retroviral incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, la LTR retroviral; el promotor SV40; y el promotor de citomegalovirus (CMV) humano descrito en Miller, *et. al.*, *Biotechniques*, Vol. 7, Nº 9, 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (*por ejemplo*, promotores celulares tales como promotores celulares eucariotas, que incluyen, pero sin limitación, los promotores de histona, pol III, y  $\beta$ -actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, promotores de adenovirus, promotores de TK, y promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado será  
15 evidente para los especialistas en la técnica a partir de los contenidos de este documento.

Después, el vector de plásmido retroviral se emplea para transducir una línea celular de empaquetamiento para formar una línea celular productora. Los ejemplos de células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, pero sin limitación, las líneas celulares PE501, PA317,  $\Psi$ -2,  $\Psi$ -AM, PA12, TA19-14X, VT-19-17-H2,  $\Psi$  CRE,  $\Psi$  CRIP, GP+E+86, GP+envAm12, y líneas celulares DAN como se describe en Miller, *Human Gene Therapy*, Vol. 1, págs. 5-14 (1990). El vector de plásmido retroviral que contiene el polinucleótido que codifica el polinucleótido antisentido, que es complementario a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, transduce las células de empaquetamiento mediante cualquier método conocido en la técnica. Tales medios incluyen,  
25 pero sin limitación, electroporación, el uso de liposomas, y precipitación por  $\text{CaPO}_4$ .

Por tanto, las células de empaquetamiento se convierten en células productoras que generan vectores retrovirales que incluyen un polinucleótido que codifica un polinucleótido antisentido que es complementario a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1. Tales vectores retrovirales, después, se transducen a  
30 las células tumorales, por lo que las células tumorales transducidas producirán el polinucleótido antisentido, que es complementario a al menos una parte del polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1.

Los vectores retrovirales se administran a un hospedador en una cantidad que es eficaz para inhibir, evitar, o destruir el crecimiento de las células tumorales mediante la inhibición de la expresión del polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 en las células tumorales. Tal administración puede ser mediante administración sistémica como se ha descrito anteriormente en este documento, o mediante inyección directa de los vectores retrovirales al tumor. En general, los vectores retrovirales se administran en una cantidad de al menos  $1 \times 10^5$  ufc/ml, y en general, tal cantidad no sobrepasa los  $1 \times 10^9$  ufc/ml. Preferiblemente, los vectores retrovirales se administran en una cantidad de entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml y aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml. La dosificación exacta que se tiene que administrar depende de una diversidad de factores que incluyen la edad, el peso, y el sexo del paciente, y el tamaño y gravedad del tumor que se está tratando.  
40

Los vectores retrovirales también se pueden administrar junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tales como, por ejemplo, solución salina, sulfato de protamina (Elkins-Sinn, Inc., Cherry Hill, N.J.), agua, tampones acuosos, tales como tampones fosfato y tampones Trio, o Polibreno (Sigma Chemical, St. Louis, MO). La selección de un vehículo farmacéuticamente adecuado se considera que será evidente para los especialistas en la técnica a partir de los contenidos de este documento.  
45

En otras células productoras retrovirales alternativas, tales como aquellas derivadas de las líneas celulares de empaquetamiento que se han descrito anteriormente en este documento, que incluyen un polinucleótido que codifica un polinucleótido antisentido, que es complementario a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, se pueden administrar a un hospedador. Tales células productoras pueden, en una realización, administrarse por vía sistémica, (por ejemplo, por vía intravenosa o por vía intraarterial) en un punto muy próximo al tumor, o las células productoras se pueden administrar directamente al tumor. La línea celular productora, después, produce vectores retrovirales que incluyen un polinucleótido que codifica un polinucleótido antisentido que es complementario a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, *in vivo*, por lo que tales vectores retrovirales transducen después las células tumorales.  
50  
55

En otra realización, el agente que inhibe la proteína ciclina G1 es un antagonista de la proteína ciclina G1 que se une a y que inhibe la proteína ciclina G1. Son ejemplos de antagonistas de la proteína ciclina G1 los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que reconocen la proteína ciclina G1.  
60

En una realización, el antagonista es un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1. La expresión "fragmento o derivado del mismo" significa un anticuerpo que tiene delecciones y/o sustituciones de residuos aminoacídicos respecto al anticuerpo no modificado, tal fragmento o derivado reconoce la proteína ciclina G1. Tal anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única.  
65

Preferiblemente, el anticuerpo se administra al hospedador de tal manera que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo entra en las células tumorales. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1 se administra al hospedador transduciendo las células tumorales del hospedador con un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1. El polinucleótido puede estar contenido en un vehículo de expresión apropiado tales como aquellos que se han descrito anteriormente en este documento. En una realización, el polinucleótido está contenido en un vector retroviral, que puede ser un vector retroviral como se ha descrito anteriormente en este documento.

El vector que incluye el polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1, se administra al hospedador en una cantidad eficaz para inhibir la función de la proteína ciclina G1 en las células tumorales en el hospedador. Cuando se emplea un vector retroviral, tal vector retroviral se administra una cantidad de entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml y aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml. Tal vector se puede administrar por vía sistémica (tal como, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal) o, alternativamente, el vector se puede administrar directamente al tumor. Los vectores, después, transducen las células tumorales, por lo que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1 se expresa en las células tumorales. Tal anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se unirá a la proteína ciclina G1 en las células tumorales, inhibiendo, de este modo, la función de la proteína ciclina G1 en las células tumorales.

Los tumores que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención, mediante la inhibición de la proteína ciclina G1, incluyen tumores no malignos, así como malignos o cancerosos. Los tumores cancerosos que se pueden tratar incluyen, pero sin limitación, sarcoma osteogénico y sarcoma de Ewing y otros trastornos neoplásicos en los que se expresa ciclina G1, tales como glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de pecho, cáncer de próstata, leucemias, linfomas (incluyendo linfoma de Hodgkin y no Hodgkin), fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de colon, cáncer pancreático, cánceres de hígado tal como carcinoma hepatocelular, y adenocarcinomas.

Los anteriores tratamientos, en los que se inhibe la ciclina G1, también se pueden emplear en combinación con otros tratamientos de tumores, tales como, por ejemplo, (i) radiación; (ii) quimioterapia; o (iii) la transducción de las células tumorales con un polinucleótido que codifica un marcador selectivo negativo, tal como, por ejemplo, un gen de timidinquinasa viral, seguido de la administración de un agente de interacción, tal como, por ejemplo, ganciclovir, que destruye las células transducidas con el polinucleótido que codifica el marcador selectivo negativo.

En una realización, se administra un agente que inhibe la proteína ciclina G1 a un hospedador de acuerdo con uno de los métodos que se han descrito anteriormente en este documento. El crecimiento de cualquier célula tumoral que contiene el agente será inhibido, evitado o destruido. Además, las células tumorales se transducen con un polinucleótido que codifica un marcador selectivo negativo o gen "suicida". El polinucleótido que codifica el marcador selectivo negativo puede estar contenido en un vehículo de expresión tales como aquellos que se han descrito anteriormente en este documento. Una vez que las células tumorales se transducen con el polinucleótido que codifica el marcador selectivo negativo, se administra un agente de interacción al hospedador, por lo que el agente de interacción interactúa con el marcador selectivo negativo para evitar, inhibir, o destruir el crecimiento de las células tumorales.

Los marcadores selectivos negativos que se pueden emplear incluyen, aunque sin limitación, timidinquinasa, tal como timidinquinasa del Virus del Herpes Simplex, timidinquinasa de citomegalovirus, y timidinquinasa del virus de varicella-zoster; y citosina desaminasa.

En una realización, el marcador selectivo negativo es una timidinquinasa viral seleccionada del grupo compuesto por timidinquinasa del Virus del Herpes Simplex, timidinquinasa de citomegalovirus, y timidinquinasa del virus de varicella-zoster. Cuando se emplean tales timidinquinasas virales, el agente de interacción o quimioterapéutico es preferiblemente un análogo de nucleósido, por ejemplo, uno seleccionado del grupo compuesto por ganciclovir, aciclovir, y 1-2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosil-5-iodouracilo (FIAU). Tales agentes de interacción se utilizan de manera eficaz por las timidinquinasas virales como sustratos, y por tanto, tales agentes de interacción se incorporan de manera letal en el ADN de las células tumorales que expresan las timidinquinasas virales, dando por tanto como resultado la muerte de las células tumorales.

En otra realización, el marcador selectivo negativo es citosina desaminasa. Cuando la desaminasa es el marcador selectivo negativo, un agente de interacción preferido es 5-fluorocitosina. La citosina desaminasa convierte la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo, que es altamente citotóxico. Por tanto, las células tumorales que expresan el gen de la citosina desaminasa convierten la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo y son destruidas.

El agente de interacción se administra en una cantidad eficaz para inhibir, evitar, o destruir el crecimiento de las células tumorales transducidas. Por ejemplo, el agente de interacción se puede administrar en una cantidad de entre 5 mg y 10 mg/kg de peso corporal, dependiendo la toxicidad global en un paciente. El agente de interacción preferiblemente se administra por vía sistémica, tal como, por ejemplo, mediante administración intravenosa, mediante administración parenteral, mediante administración intraperitoneal, o mediante administración intramuscular.

Cuando un vehículo de expresión, tales como aquellos que se han descrito anteriormente en este documento, incluyendo un marcador selectivo negativo se administra a células tumorales, se puede producir un "efecto testigo", es decir, las células tumorales que originalmente no se transducen con la secuencia de ácido nucleico que codifica el mar-



5 cador selectivo negativo se pueden destruir después de la administración del agente de interacción. A pesar de que los Solicitantes no pretenden limitarse a ningún razonamiento teórico, las células tumorales transducidas pueden producir una forma difusible del marcador selectivo negativo que actúa extracelularmente después del agente de interacción, o se capta por células tumorales adyacentes; no transducidas, que después se convierten en susceptibles a la acción del agente de interacción. También es posible que uno o ambos del marcador selectivo negativo y el agente de interacción se comuniquen entre células tumorales.

10 Los agentes que inhiben la proteína ciclina G1 también pueden evitar la reestenosis vascular después de procedimientos vasculares invasivos tales como angioplastia, injertos vasculares, tales como injertos arteriales, o cirugía de derivación coronaria. Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para evitar la reestenosis que comprende administrar a un hospedador, o al sitio de un procedimiento vascular invasivo o lesión vascular, un agente que inhiba la proteína ciclina G1. El agente se administra en una cantidad eficaz para evitar la reestenosis en un hospedador. El agente se puede administrar durante o después del procedimiento vascular invasivo. La expresión "procedimiento vascular invasivo" como se usa en este documento significa cualquier procedimiento que implique reparación, retirada, sustitución y/o redirección (por ejemplo, derivación o shunt) de un parte del sistema vascular incluyendo, aunque sin limitación, arterias y venas. Tales procedimientos incluyen, aunque sin limitación, angioplastia, injertos vasculares tales como injertos arteriales, retiradas de coágulos de sangre, retiradas de porciones de arterias o venas, y cirugía de derivación coronaria.

20 Los agentes que inhiben la proteína ciclina G1 que se pueden emplear, incluyen, pero sin limitación, aquellos que se han descrito anteriormente. Preferentemente, el agente que inhibe la proteína ciclina G1 es un polinucleótido antisentido que es complementario a, y por tanto, es capaz de unirse a, o hibridar con, al menos un parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 como se ha descrito anteriormente en este documento. Tal oligonucleótido antisentido puede tener una longitud como se ha descrito anteriormente y se puede administrar en una cantidad eficaz para evitar la reestenosis. Tal cantidad puede ser como se ha descrito anteriormente en este documento. El oligonucleótido antisentido se puede administrar por vía intravascular, y se puede administrar directamente en el sitio del procedimiento vascular invasivo o la lesión vascular.

30 En una realización preferida, el oligonucleótido antisentido se administra al hospedador transduciendo las células vasculares en el sitio de un procedimiento vascular invasivo o una lesión vascular con un polinucleótido que codifica un polinucleótido antisentido que es complementario a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1. Tal polinucleótido que codifica el polinucleótido antisentido puede estar contenido en un vehículo de expresión apropiado como se ha descrito anteriormente en este documento, que se transduce a las células del sitio de un procedimiento vascular invasivo o lesión vascular. En una realización, el vehículo de expresión es un vector viral, tal como aquellos que se han descrito anteriormente en este documento. En una realización, el vector viral es un vector retroviral, que puede ser como se ha descrito anteriormente en este documento.

40 Cuando se emplea un vector retroviral, tal vector retroviral se administra en una cantidad como se ha descrito anteriormente en este documento, y se administra por vía intravascular. En una realización, el vector retroviral se administra al sitio del procedimiento vascular invasivo o lesión vascular. Los vectores transducen las células vasculares en el sitio del procedimiento vascular invasivo o lesión vascular, por lo que el oligonucleótido antisentido se produce en tales células, inhibiendo por lo tanto la expresión de un polinucleótido que codifica la ciclina G1 en tales células y evitando por tanto la reestenosis evitando la proliferación de tales células.

45 En otra realización, el agente que inhibe la proteína ciclina G1 es un antagonista de la proteína ciclina G1 que se une a y que inhibe la proteína ciclina G1 como se ha descrito anteriormente en este documento, y en una realización puede ser un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1.

50 El anticuerpo se administra al hospedador de tal forma que el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo entra en las células del sitio del procedimiento vascular invasivo o lesión vascular. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1 se administra transduciendo las células en el sitio del procedimiento vascular invasivo o de una lesión vascular con un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1. El polinucleótido puede estar contenido en un vehículo de expresión apropiado tales como aquellos que se han descrito anteriormente en este documento. En una realización, el vehículo de expresión es un vector retroviral como se ha descrito anteriormente en este documento, que se puede administrar en una cantidad como se ha descrito anteriormente en este documento. Tal vector se administra por vía intravascular como se ha descrito anteriormente en este documento, y se puede administrar directamente en el sitio de un procedimiento vascular invasivo o lesión vascular.

60 Este método se puede aplicar para la prevención y el tratamiento de reestenosis y la prevención o tratamiento de lesiones vasculares después de una diversidad de procedimientos vasculares invasivos, incluyendo, pero sin limitación, angioplastia cardiovascular, injertos arteriales, y cirugía de derivación coronaria. Este método también se aplica para la prevención y tratamiento de lesiones vasculares incluyendo, pero sin limitación, lesiones de las arterias femoral, carótida o renal, particularmente arterias renales asociadas a fístulas de diálisis renal.

65 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in-vitro* para inmortalizar células no tumorales que comprende transducir las células no tumorales con un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 o un derivado o análogo de la misma. La expresión "derivado o análogo de la misma" como se usa en este

documento significa que la proteína puede ser una proteína que tiene deleciones y/o sustituciones de los residuos aminoácidos con respecto a la secuencia de proteína ciclina G1 nativa, mantiene las mismas propiedades biológicas que la proteína ciclina G1 nativa o no modificada. Aunque no se pretende limitar el alcance de este aspecto de la presente invención a ningún razonamiento teórico, los Solicitantes han descubierto que la sobreexpresión de la proteína ciclina G1 en células no tumorales, contribuiría a la inmortalización de las células y a líneas celulares permanentes que mantendrían la capacidad de responder a sucesos de ciclo celular posteriores, y evitar el uso de oncogenes virales que provocan la transformación celular.

El polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 o un fragmento o un derivado de la misma, puede estar contenido en un vehículo de expresión apropiado, que puede ser como se ha descrito anteriormente en este documento. En una realización, el vehículo de expresión es un vector retroviral, que puede ser como se ha descrito anteriormente en este documento.

Las células no tumorales que se pueden transducir de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen, pero sin limitación, fibroblastos, hepatocitos, células musculares, células endoteliales, y células epiteliales.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un método *in-vitro* para potenciar la transducción de células con un vector retroviral. El método comprende transducir las células con un primer vehículo de expresión que incluye un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1. El primer vehículo de expresión no es un vector retroviral. Las células también se transducen con un segundo vehículo de expresión que incluye preferiblemente un polinucleótido que codifica un agente terapéutico. El segundo vehículo de expresión es un vector retroviral. Este método se puede usar para transducir células *in vivo* o *ex vivo* o *in vitro*.

El primer vehículo de expresión puede ser cualquier vehículo de expresión que no sea un vector retroviral. Tales vehículos de expresión incluyen, pero sin limitación, vectores de plásmidos, vectores eucariotas, vectores procariotas (tales como, por ejemplo, vectores bacterianos), y vectores virales diferentes de vectores retrovirales, incluyendo, pero sin limitación, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores de Herpes virus, y vectores de virus vaccinia.

En una realización preferida, el primer vehículo de expresión es un vector adenoviral. Aunque esta realización no está limitada por ningún razonamiento teórico, la proteína ciclina G1 se induce en una fase G1 muy temprana, cuando sucede la activación celular. La transducción de las células con un vector adenoviral incluyendo un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 proporciona la sobreexpresión transitoria de proteína ciclina G1 en las células, activando de este modo las células, y permitiendo la integración aumentada del vector retroviral que incluye el polinucleótido que codifica el agente terapéutico en las células. Tal método se puede aplicar particularmente para la introducción de vectores retrovirales en células con bajos índices de replicación y baja eficacia de transducción.

El vector adenoviral que se emplea puede, en una realización, ser un vector adenoviral que incluye esencialmente todo el genoma adenoviral (Shenk *et al.*, *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 111(3): 1-39 (1984). Alternativamente, el vector adenoviral puede ser un vector adenoviral modificado en el que se ha eliminado al menos una parte del genoma adenoviral.

En la realización preferida, el vector adenoviral comprende una ITR 5' adenoviral; una ITR 3' adenoviral; una señal de encapsidación adenoviral; una secuencia ADN que codifica la proteína ciclina G1; y un promotor que controla la secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1. El vector carece de al menos de la mayoría de las secuencias de ADN de E1 y E3 adenovirales, pero no carece de todas las secuencias de ADN de E2 y E4, y secuencias de ADN que codifican proteínas adenovirales promovidas por el promotor tardío principal adenoviral.

En una realización, el vector también carece de al menos una parte, de al menos una secuencia de ADN seleccionada del grupo compuesto por las secuencias de ADN de E2 y E4.

En otra realización, el vector carece de al menos la mayoría de las secuencias de ADN de E1 y E3 adenovirales, y carece de una parte del resto de las secuencias de ADN de E2 y E4.

En otra realización más, el gen en la región E2a que codifica la proteína de unión de 72 kilodalton está mutada para producir una proteína sensible a temperatura que se activa a 32°C, la temperatura a la que se producen las partículas virales. Este mutante sensible a temperatura se describe en Ensinger *et al.*, *J. Virology*, 10:328-339 (1972), Van der Vliet *et al.*, *J. Virology*, 15:348-354 (1975) y Friefeld *et al.*, *Virology*, 124:380-389 (1983).

Tal vector, en una realización preferida, se construye construyendo en primer lugar, de acuerdo con técnicas convencionales, un plásmido lanzadera que contiene, comenzando en el extremo 5', los "elementos críticos del extremo izquierdo", que incluyen una ITR 5' adenoviral, una señal de encapsidación adenoviral, y una secuencia potenciadora E1a; un promotor (que puede ser un promotor adenoviral o un promotor extraño); un sitio de clonación múltiple (que puede ser como se ha descrito en este documento); una señal poli A; y un segmento de ADN que se corresponde a un segmento del genoma adenoviral. El vector también puede contener una secuencia líder triparental. El segmento de ADN que se corresponde al genoma adenoviral sirve como un sustrato para recombinación homóloga con un adenovirus modificado o mutado, y tal secuencia puede comprender, por ejemplo, un segmento del genoma del adenovirus 5 no mayor de base 3329 a base 6246 del genoma. El plásmido también puede incluir un marcador que se puede selec-

cionar y un origen de replicación. El origen de replicación puede ser un origen de replicación bacteriano. Los ejemplos representativos de tales plásmidos lanzadera incluyen pAvS6, que se describe en las Solicitudes publicadas PCT N° WO94/23582, publicada el 27 de octubre de 1994, y WO95/09654, publicada el 13 de abril de 1995. La secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1 se puede insertar después en el sitio de clonación múltiple para producir un vector de plásmido.

Esta construcción se usa después para producir un vector adenoviral. Se realiza la recombinación homóloga con un adenovirus modificado o mutado en el que al menos la mayoría de las secuencias de ADN adenovirales de E1 y E3 se han eliminado. Tal recombinación homóloga se puede realizar mediante co-transfección del vector de plásmido y el adenovirus modificado en una línea celular auxiliar, tales como células 293, por precipitación con CAPO<sub>4</sub>. Después de tal recombinación homóloga, se forma un vector adenoviral que incluye secuencias de ADN derivadas del plásmido lanzadera entre el sitio Not I y el fragmento de recombinación homólogo, y ADN derivado del adenovirus eliminado de E1 y E3 entre el fragmento de recombinación homólogo y la ITR 3'.

En una realización, el fragmento de recombinación homólogo se superpone con los nucleótidos 3329 a 6246 del genoma del adenovirus 5 (ATCC VR-5).

Mediante tal recombinación homóloga, se forma un vector que incluye una ITR 5' adenoviral, una señal de encapsidación adenoviral; una secuencia potenciadora E1a; un promotor; una secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1; una señal poli A; ADN adenoviral libre de al menos la mayoría de las secuencias de ADN adenoviral de E1 y E3; y una ITR 3' adenoviral. El vector también puede incluir una secuencia líder triparental. El vector se puede transfectar después en una línea celular auxiliar, tal como la línea celular auxiliar 293 (ATCC N° CRL1573), que incluirá las secuencias de ADN de E1a y E1b, que son necesarias para la replicación viral, y para generar las partículas adenovirales. La transferencia se puede realizar mediante electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección o mediante proteoliposomas.

El vector que se ha descrito anteriormente en este documento puede incluir un sitio de clonación múltiple para facilitar la inserción de la secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1 en el vector de clonación. En general, el sitio de clonación múltiple incluye sitios de enzimas de restricción "raros"; es decir, sitios que se encuentran en genes eurocariotas con una frecuencia de entre aproximadamente 1 entre cada 10.000 y aproximadamente 1 en cada 100.000 pares de bases. Por tanto, un vector apropiado se forma cortando el vector de clonación mediante técnicas convencionales en sitios de restricción apropiados en el sitio de clonación múltiple, y ligando después la secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1 en el vector de clonación.

La secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1 está bajo el control de un promotor adecuado, que se puede seleccionar de los que se han descrito en este documento, o tal ADN puede estar bajo el control de su propio promotor nativo.

En una realización, el adenovirus se puede construir usando un cromosoma artificial de levadura (o YAC) que contiene un genoma adenoviral de acuerdo con el método descrito en Ketner, *et al.*, *PNAS*, Vol. 91, págs. 6186-6190 (1994), junto con los contenidos de este documento. En esta realización, el cromosoma artificial de levadura de adenovirus se produce mediante recombinación homóloga *in vivo* entre ADN adenoviral y vectores de plásmido de cromosoma artificial de levadura que llevan segmentos de los extremos genómicos izquierdos y derechos adenovirales. Una secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1 se puede clonar después en el ADN adenoviral. El genoma adenoviral modificado, después, se elimina del cromosoma artificial de levadura de adenovirus para usarlo para generar partículas de vector adenoviral como se ha descrito anteriormente en este documento.

El vector retroviral, que es el segundo vehículo de expresión, puede ser como se ha descrito anteriormente en este documento. Tal vector retroviral incluye un polinucleótido que codifica un agente terapéutico. El término "terapéutico" se usa en un sentido genérico e incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos y agentes de sustitución.

Los polinucleótidos que codifican agentes terapéuticos que pueden estar contenidos en el vector de plásmido retroviral incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos que codifican genes del factor de necrosis tumoral (TNF), tal como TNF- $\alpha$ ; genes que codifican interferones tales como Interferón- $\alpha$ , Interferón- $\beta$  e Interferón- $\gamma$ ; genes que codifican interleucinas tales como IL-1, IL-1 $\beta$ , e Interleucinas 2 a 14; genes que codifican GM-CSF; genes que codifican la adenosina desaminasa, o ADA; genes que codifican factores de crecimiento celular, tales como linfocinas, que son factores de crecimiento para linfocitos; genes que codifican el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); genes que codifican CD4 soluble; Factor VIII; Factor IX; citocromo b; glucocerebrosidasa; receptores de células T; el receptor de LDL, ApoE, ApoC, ApoAI y otros genes implicados en el transporte y metabolismo del colesterol; el gen de la  $\alpha$ -1 antitripsina (alAT); el gen de la insulina; el gen de hipoxantina fosforibosil transferasa; el gen CFTR; marcadores selectivos negativos o genes "suicidas", tales como genes de timidinquinasa viral, tales como el gene de la timidinquinasa del Virus Herpes Simplex, el gene de la timidinquinasa viral del citomegalovirus, y el gen de la timidinquinasa del virus varicella-zoster; receptores Fc para dominios de unión a antígenos de anticuerpos, secuencias antisentido que inhiben la replicación viral, tales como secuencias antisentido que inhiben la replicación de virus de la hepatitis B o hepatitis no A no B; oligonucleótidos *c-myc* antisentido; y antioxidantes tales como, pero sin limitación, manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD), catalasa, cobre-zinc-superóxido dismutasa (CuZn-SOD), superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD), y glutatión reductasa; activador del plasminógeno tisular (tPA); activador del plasminógeno urinario (uroquinasa); hirudina; el gen de la fenilalanina

hidroxilasa; sintetasa de óxido nítrico; péptidos vasoactivos; péptidos angiogénicos; el gen de la dopamina; el gen de la distrofina; el gen de la  $\beta$ -globina; el gen de la  $\alpha$ -globina; el gen de HbA; protooncogenes tales como los genes *ras*, *src*, y *bcl*; y genes supresores de tumores tales como p53 y Rb; el receptor de LDL; el gen de la proteína heregulin- $\alpha$  para tratar cánceres de pecho, ovario, gástricos y endometriales; anticuerpos monoclonales específicos para epítomos contenidos en la cadena  $\beta$  de un receptor de antígeno de célula T; el gen de la resistencia múltiple a fármacos (MDR); polinucleótidos que codifican riboenzimas; polinucleótidos antisentido; genes que codifican péptidos de secreción que actúan como inhibidores competitivos de la enzima convertidora de angiotensina, de canales de calcio de células de músculo liso vasculares, o de receptores adrenérgicos, y polinucleótidos que codifican enzimas que retiran placas amiloides en el sistema nervioso central. Sin embargo, se entiende que el alcance de la presente invención no se limita a ningún agente terapéutico particular.

El polinucleótido que codifica el agente terapéutico está bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, el LTR retroviral; el promotor SV40; el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del Virus del Sarcoma de Rous (RSV); el promotor de histona; el promotor de pol III, el promotor de  $\beta$ -actina; promotores inducibles; tales como el promotor MMTV, el promotor de metalotio-neína, promotores de choque térmico; promotores de adenovirus; el promotor de la albúmina; el promotor de ApoAI; promotores del parvovirus B19; promotores de globina humana; promotores de timidinquinasa viral, tal como el promotor de timidinquinasa del Herpes Simplex; LTR retrovirales; promotores de hormona de crecimiento humana, y el promotor inducible MxIFN. El promotor también puede ser el promotor nativo que controla el polinucleótido que codifica el agente terapéutico. Sin embargo, se entiende que el alcance de la presente invención no se limita a genes o promotores extraños específicos.

El primer vehículo de expresión, que preferiblemente es un vector adenoviral, que incluye una secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1 o un derivado análogo de la misma; y el vector retroviral, que incluye un polinucleótido que codifica el agente terapéutico, puede transducir células *in vivo* o *in vitro*.

En una realización, las células se transducen con el primer vehículo de expresión, que es preferiblemente un vector adenoviral, antes de la transducción de las células con el segundo vehículo de expresión (es decir, el vector retroviral). En otra realización, las células se transducen con el primer vehículo de expresión y el segundo vehículo de expresión de forma simultánea.

En los siguientes párrafos, los métodos *in vivo* y métodos de tratamiento mencionados no son, como tales, parte de la presente invención.

Cuando se administra *in vivo*, el vector adenoviral se administra en una cantidad eficaz para transducir las células deseadas con el polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1. El vector adenoviral se puede administrar por vía sistémica, tal como, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraarterial o intraperitoneal. Alternativamente, el vector adenoviral se puede administrar mediante inyección directa no sistémica a un tejido, órgano, o masa de células deseada, tal como, por ejemplo, un tumor. En general, el vector adenoviral se administra con una multiplicidad de infección de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10.

El vector retroviral se administra al hospedador animal *in vivo* en una cantidad eficaz para producir un efecto terapéutico en el animal.

El animal puede ser un mamífero, incluyendo primates humanos y no humanos. Los vectores retrovirales se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa o intraarterial o intraperitoneal, o mediante inyección no sistémica directa en un tejido, órgano, o masa de células deseada, tal como, por ejemplo, un tumor.

Los vectores retrovirales se administran a un animal en una cantidad eficaz para producir un efecto terapéutico en el animal. En general, los vectores retrovirales se administran en una cantidad de al menos  $1 \times 10^5$  ufc/ml, y en general, tal cantidad no sobrepasa las  $1 \times 10^9$  ufc/ml. Preferiblemente, los vectores retrovirales se administran en una cantidad entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml a aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml. La dosificación exacta que se tiene que administrar depende de diversos factores, incluyendo la edad, la altura, el peso y el sexo del paciente, el trastorno que se está tratando, y la gravedad del mismo.

Los vectores retrovirales y los vectores adenovirales se administran cada uno al paciente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, una solución salina fisiológica. Otros vehículos farmacéuticos incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, alúmina y vesículas lipídicas, tales como liposomas. La selección de un vehículo farmacéuticamente aceptable se estima dentro del alcance para los especialistas en la técnica a partir de los contenidos de este documento.

En una realización, las células eucariotas que se transducen *in vivo* con los vectores retrovirales y adenovirales son células humanas primarias. El gen que codifica un agente terapéutico puede ser cualquier gen que tenga utilidad clínica, por ejemplo, genes terapéuticos o marcadores. Preferiblemente, las células humanas primarias son células sanguíneas. La expresión "células sanguíneas" como se usa en este documento incluye todas las formas de células sanguíneas nucleadas, así como progenitores y precursores de las mismas.

## ES 2 288 756 T3

El gen llevado por las células sanguíneas puede ser cualquier gen que potencie directamente los efectos terapéuticos de las células sanguíneas. El gen llevado por las células sanguíneas puede ser cualquier gen que permita que las células sanguíneas ejerzan un efecto terapéutico que no tendrían de forma normal, tal como un gen que codifica un factor de coagulación (por ejemplo, Factor VIII o Factor IX) útiles en el tratamiento de hemofilia. El gen puede codificar uno o más productos que tienen efectos terapéuticos. Los ejemplos de genes adecuados incluyen aquéllos que codifican citoquinas tales como el TNF, interleucinas (interleucinas 1-12), interferones (interferones  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), proteínas de receptor de células T y receptores Fc para unirse a anticuerpos.

Los vectores retrovirales son útiles en el tratamiento de una diversidad de enfermedades incluyendo, pero sin limitación, la deficiencia de adenosina desaminasa, anemia de células falciformes, talasemia, hemofilia, diabetes, deficiencia de  $\alpha$ -antitripsina, trastornos cerebrales tal como la enfermedad de Alzheimer, y otras enfermedades tales como trastornos del crecimiento y enfermedades cardíacas, por ejemplo, aquellas provocadas por alteraciones en la manera que se metaboliza el colesterol y defectos del sistema inmune.

En una realización, los vectores retrovirales pueden incluir un marcador selectivo negativo, tal como, por ejemplo, un gen de timidinaquinasa viral, y más particularmente, el gen de la timidinaquinasa (TK) del Virus Herpes Simplex. Tales vectores retrovirales se pueden administrar junto con los vectores adenovirales que se han descrito anteriormente en este documento a células tumorales (en particular a células cancerosas) en un paciente humano *in vivo*. Los vectores adenovirales y los vectores retrovirales, después, transducen las células tumorales. Después de que los vectores retrovirales hayan transducido las células tumorales, al paciente se le da un agente de interacción, tal como ganciclovir o aciclovir, que interactúa con la proteína expresada por el marcador selectivo negativo para destruir todas las células en replicación (es decir, todas las células cancerosas) que se han transducido con el vector retroviral que incluye el marcador selectivo negativo.

Los vectores adenovirales y los vectores retrovirales que se han mencionado anteriormente en este documento también se pueden administrar en un modelo animal para determinar la efectividad de un tratamiento de terapia génica. Por ejemplo, un vector adenoviral que incluye un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 y un vector retroviral que incluye un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, se pueden administrar a animales de la misma especie. El vector retroviral se administra a los animales en cantidades variables. Para determinar la efectividad del tratamiento de terapia génica en el animal, se puede determinar una cantidad eficaz del vector retroviral que se tiene que administrar a un paciente humano.

En otra realización, los vectores adenovirales, que incluyen una secuencia de ADN que codifica la proteína ciclina G1, se administran *in vivo* a un paciente junto con células productoras retrovirales que generan vectores retrovirales que incluyen un polinucleótido que codifica un agente terapéutico.

Tal realización se puede aplicar particularmente para tratamientos de tumores (incluyendo tumores malignos y no malignos), tales como, por ejemplo, tumores de hígado, tumores óseos, y tumores de pulmón. Por ejemplo, las células productoras pueden incluir un vector de plásmido retroviral que incluye un marcador selectivo negativo. Los vectores adenovirales y las células productoras retrovirales se administran después al tumor, por lo que las células productoras generan partículas de vector retroviral que incluyen el polinucleótido que codifica el marcador selectivo negativo. Los vectores adenovirales y las partículas de vector retroviral generadas por las células productoras retrovirales transducen las células tumorales, por lo que las células tumorales producen el marcador selectivo negativo. Después de la administración de un agente de interacción al paciente, las células tumorales transducidas se destruyen.

Alternativamente, los vectores adenovirales y el vector retroviral pueden transducir células eucariotas, *in vitro*, por lo que las células eucariotas se cultivan *in vitro* para la producción *in vitro* del agente terapéutico, o, alternativamente, las células eucariotas transducidas se pueden administrar a un hospedador como parte de un procedimiento de terapia génica, por lo que las células eucariotas transducidas expresan el agente terapéutico *in vivo* en un hospedador.

Como se ha señalado anteriormente en este documento, los anteriores métodos de la presente invención se pueden realizar mediante el uso de vehículos de expresión apropiados, que contienen un polinucleótido que codifica un agente que inhibe la proteína ciclina G1 (cuando se desea tratar un tumor mediante la inhibición de la proteína ciclina G1), o un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 (cuando se desea inmortalizar una línea celular o potenciar la transducción retroviral de células). Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un vehículo de expresión que incluye un polinucleótido que codifica un agente que, en una realización, es un agente que inhibe la proteína ciclina G1. Tales agentes incluyen aquellos que se han descrito anteriormente en este documento, tales como, por ejemplo, polinucleótidos antisentido o anticuerpos o fragmentos o derivados del mismo que reconocen la proteína ciclina G1, o un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina. En otra realización, el polinucleótido codifica la proteína ciclina G1.

El vehículo de expresión se puede seleccionar de los que se han descrito anteriormente en este documento, y preferiblemente puede ser un vector viral, incluyendo vectores de virus ARN y vectores de virus ADN como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el vector viral es un vector de virus ARN, y preferiblemente es un vector retroviral, tales como aquellos que se han descrito anteriormente en este documento. En otra realización, el vector viral es un vector de

## ES 2 288 756 T3

virus ADN, y preferiblemente es un vector adenoviral, tales como aquellos que se han descrito anteriormente en este documento.

Además, se proporciona un método para detectar cáncer mediante detección de la expresión aumentada de la proteína ciclina G1, detectándose tal expresión aumentada detectando cantidades aumentadas de polinucleótidos que codifican la proteína ciclina G1, o detectando cantidades aumentadas de la proteína ciclina G1, en comparación con las células normales no cancerosas. El método comprende poner en contacto las células con un agente que se une a (i) proteína ciclina G1 y/o (ii) un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1. Después se determina la unión del agente a la proteína ciclina G1 y/o un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1.

La proteína ciclina G1 se expresa intracelularmente, y para ensayar la expresión aumentada de proteína ciclina G1, se emplean procedimientos apropiados antes de poner en contacto las células con un agente que se une a la proteína ciclina G1 y/o a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, para permitir la unión del agente en el ensayo. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitación, la fijación de una muestra histológica de células antes del ensayo.

Los agentes que se pueden emplear en este aspecto incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos (*por ejemplo*, sondas de ADN o ARN) que hibridan con un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, y anticuerpos o fragmentos o derivados del mismo que reconocen la proteína ciclina G1.

En una realización, el agente es un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1.

En otra realización, el agente es un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo que reconoce la proteína ciclina G1. Tales anticuerpos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos de cadena única.

Determinadas propiedades del cáncer se pueden determinar mediante el análisis de la cantidad de unión a proteína ciclina G1 expresada en las células, o la cantidad de unión a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 presente en las células. Una determinación de una cantidad elevada de unión del agente a proteína ciclina G1 en comparación a la observada en células normales, o a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 puede indicar la presencia de células cancerosas. Los cánceres que se pueden determinar de acuerdo con este método incluyen sarcoma osteogénico y sarcoma de Ewing, y otros trastornos neoplásicos en los que se expresa ciclina G1, tales como aquéllos que se han descrito anteriormente en este documento.

La determinación de la unión del agente a la proteína ciclina G1 o a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 se puede determinar mediante una diversidad de métodos de ensayo conocidos por los especialistas en la técnica. Tales ensayos incluyen, pero sin limitación, ensayos sándwich directos e indirectos, ensayos colorimétricos y ensayos ELISA.

En los anteriores ensayos, el agente que se une a la proteína ciclina G1 o al polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, o un agente de unión que se une al agente cuando se emplea un ensayo sándwich indirecto, se acopla a una etiqueta o marcador detectable. Tales etiquetas o marcadores incluyen, pero sin limitación, isótopos radioactivos de, por ejemplo, yodo, cobalto o tritio; una enzima; un tinte fluorescente; un tinte absorbente; una sustancia quimio-luminiscente; y una etiqueta de espín; biotina; hematoxilina; una partícula coloreada o cualquier otra sustancia de marcación conocida por los especialistas en la técnica.

En una realización, las células fijadas, sospechosas de ser células cancerosas, se ponen en contacto con un anticuerpo que reconoce la proteína ciclina G1. La detección del anticuerpo unido se puede determinar mediante un ensayo sándwich indirecto empleando un complejo biotina-avidina, tal como un complejo de biotina-estreptavidina que se une al anticuerpo. La avidina se une a una enzima tal, como por ejemplo, fosfatasa alcalina. La muestra se pone en contacto con un sustrato para la enzima, que produce un producto de reacción coloreado. Midiendo el desarrollo del producto de reacción coloreado, se puede determinar la cantidad de proteína ciclina G1 en la muestra de células, determinando, por tanto, la presencia de cáncer y/o el alcance y la gravedad del mismo.

### Ejemplos

La invención se describirá a continuación respecto a los siguientes ejemplos, sin embargo, no se pretende limitar el alcance de la presente invención por lo mismos.

#### Ejemplo 1

##### *Materiales y métodos*

##### *Clonación de construcciones de expresión de ciclina G1 antisentido, ciclina D1 antisentido y p21/WAF1/CIP1*

Se prepararon las regiones codificantes completas de ciclina G1 humana (Figura 1) (Wu, *et al.*, *Oncol. Reports*, Vol. 1, págs. 705-711 (1994)), ciclina D1 (Xiong, *et al.*, *Cell*, Vol. 65, págs. 691-699 (1991)) y p21/WAF1/CIP1 (Harper, *et al.*, *Mol. Biol. Cell.*, Vol. 6, págs. 387-400 (1995); El-Deiry, *et al.*, *Cell*, Vol. 75, págs. 817-825 (1993)), incluyendo los

## ES 2 288 756 T3

codones de parada, mediante amplificación por PCR-RT dirigida por cebador. Para crear la construcción de expresión de ciclina G1 antisentido (aG1), se libera el fragmento N-terminal de 586 pb, incluyendo -65 pb de la región no traducida, mediante digestión doble con XbaI/HpaI del gen *CYCG1* aislado originalmente de una biblioteca de ADNc de fibroblasto WI-38 humano (ATCC, Rockville, Maryland), y después se clonó mediante ligamiento romo en el vector pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, California) en el sitio EcoRV. La región N-terminal 605 de la ciclina D1 (orientación antisentido, aD1) y la región codificante completa de 495 pb de *WAF1/CIP1* (p21) se liberaron mediante digestión con NdeI/NcoI y NdeI/EcoRI, respectivamente, seguido por clonación de extremos romos en el vector pcDNA3 en el sitio Eco RV. La estructura de cada construcción se confirmó mediante análisis de secuencia de ADN manual, usando un método de terminación de cadena dideoxi modificado (United States Biochemicals).

*Construcción de Vectores Retrovirales Que Llevan Genes de Control de Ciclo Celular (G1aG1SvNa, G1aD1SvNa, y G1p21SvNa):* Fuente de Vector Retroviral, pG1XSvNa; Fuente de Inserto, pcDNA3aG1, pcDNA3aD1, pcDNA3p21).

Para crear cada vector retroviral se digirió pG1XSvNa (Genetic Therapy, Inc., Gaithersburg, Maryland), con NotI, los fosfatos 5' se retiraron mediante tratamiento con fosfatasa alcalina intestinal de ternero, y el fragmento resultante después se purificó en gel (agarosa al 1%), se extrajo y se electroeluyó. El pG1XSvNa es un vector de plásmido retroviral derivado de pG1 (descrito en la solicitud PCT N° WO91/10728 publicada el 25 de julio de 1991), y que incluye una LTR 5' retroviral, una LTR 3' retroviral, una región de clonación múltiple y un gen de resistencia a neomicina bajo el control del promotor SV40. El pG1XSvNa adicionalmente se describe en la solicitud PCT N° WO95/09654, publicada el 13 de abril de 1995. Este procedimiento generó un fragmento de ADN de 5856 pb de longitud que no puede relegar o recircularizar. Para aislar los fragmentos de inserción aG1, AD1 y p21, los respectivos ADN de plásmido se digirieron doblemente con HindIII/NotI para aG1, y EcoRI/NotI para aD1 y p21 respectivamente. Estos productos de digestión se resolvieron en geles de agarosa al 1% dando el fragmento de 597 pb HindIII/NotI de aG1, el fragmento de 632 pb EcoRI/NotI de aD1, y el fragmento de 522 pb EcoRI/NotI de p21. Estas bandas después se extrajeron del gel de agarosa y se sometieron a electroelución. El extremo NotI de cada inserto se ligó al extremo NotI del vector digerido pG1XSvNa, y se aisló en geles de agarosa al 1% dando fragmentos de aG1, aD1 y p21 de 6453, 6488 y 6378 pb respectivamente. Cada fragmento se sometió después a electroelución y se trató con el fragmento Klenow para generar extremos romos, y después se ligó para generar ADN de plásmido cerrado incluyendo los respectivos genes de interés. Se determinaron la clonación y la orientación del inserto exitosas mediante análisis de restricción. Los fragmentos de ADN esperados generados mediante digestión con BstEII y NotI fueron de 920, 955 y 845 pb para insertos aG1, aD1 y p21 respectivamente, y  $\pm$  5500 pb para el ADN del vector.

### *Sobrenadantes de Vector Retroviral y Líneas Celulares Productoras*

Los vectores de expresión de  $\beta$  galactosidasa y HStk se suministraron amablemente como clones de células de empaquetamiento PA317 de alto título (títulos:  $1,3 \times 10^6$  y  $4,9 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias G418<sup>r</sup>, ufc/ml para vectores de  $\beta$  galactosidasa y HStk respectivamente) por Genetic Therapy, Inc. (Gaithersburg, MD). Los 3 vectores de plásmido retrovirales experimentales que llevan ADNc de enzima de control de ciclo celular se empaquetaron en células PA317 (Miller, *et al. Mol. Cell. Biol.*, Vol. 6, págs. 2895-2902 (1986)), y se ensayaron como sobrenadantes de vector agrupados (título de vector:  $1 \times 10^6$  ufc/ml cada uno). Los vectores se denominan G1BgSvNa, G1TK1SvNa, G1p21SvNa, G1aD1SvNa y G1aG1SvNa para indicar el orden de los promotores y regímenes codificantes contenidas en cada vector (vector G1, secuencias de repetición terminal larga (LTR) del Virus de la leucemia Murina de Moloney; Bg, gen de  $\beta$  galactosidasa o *lacZ*; HStk, gen de timidinquinasa del Herpes Simplex; aG1, ciclina G1 humana antisentido; aD1, ciclina D1 antisentido; p21, gen de inhibidor de Cdk p21/Waf1/Cip1; Sv, promotor/potenciador de región temprano SV40; y Na.7, gen *neo<sup>r</sup>*, clon 7). El vector retroviral G1TK1SvNa 7 se describe adicionalmente en la Solicitud PCT N° WO95/09654, publicada el 13 de abril de 1995. El vector retroviral G1BgSvNa se generó a partir del plásmido pG1BgSvNa. El pG1BgSvNa se construyó digiriendo pSvNa (Solicitud PCT N° WO95/09654) y pG1Bg (Solicitud PCT N° WO91/10728) con Sall y HindIII. El fragmento Sall-HindIII de pSvNa que contiene el promotor SV40 y un gen de resistencia a neomicina se ligó al pG1Bg digerido de Sall/HindIII para formar pG1BgSvNa.

La fuente de vector, G1XSvNa, que contiene solamente el gen *neo<sup>r</sup>* controlado por el promotor SV40 se usó como un control para los efectos de la transducción de genes y selección por G418.

### *Células, Condiciones de Cultivo Celular y Transducción de Células con lacZ, Genes de Control del Ciclo Celular, y vectores HStk*

Se cultivaron células de sarcoma osteogénico humano (MG-63, ATCC N° CRL 1427) y fibroblastos humanos diploides normales primarios (de origen hepático) con una densidad de cultivo de  $2,5 \times 10^4$  células en cada una de las placas de seis pocillos, en DMEM suplementado con FBS al 10% (D10). Después de la unión durante una noche, las células se expusieron a 1 ml del respectivo vector retroviral en la presencia de Polibreno ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) durante 2 horas, después de lo cual se añadió 1 ml de D10 nuevo a cada pocillo. Cuarenta y ocho horas después de la transducción con el vector *lacZ*, se midió la eficacia de la transferencia de genes determinando el porcentaje de células positivas a *lacZ*, después de la tinción X-gal y microscopía óptica.

### *Citotoxicidad por Ganciclovir (GCV)/Efectos Testigo en Células MG-63 Transducidas con Vector HStk*

Los estudios iniciales de dosis-repuesta determinaron la sensibilidad de células MG-63 y las concentraciones óptimas de G418 usadas para seleccionar las células transducidas. Después de la selección por G418, se expusieron

proporciones variables de células MG-63 transducidas con HStk y no transducidas (densidad de cultivo  $2,5 \times 10^4$  células) a  $20 \mu\text{g}$  GCV/ml D10 en cada una de las placas de seis pocillos, durante 10 días. Por tanto, los efectos testigo de GCV en MG-63 transducidas con HStk, se midieron determinando el grado de confluencia de células en cada pocillo en cultivos de 10 días. Los efectos testigo del tratamiento con GCV se compararon con aquellos de células NIH 3T3 transducidas con HStk (ATCC N° CRL 1658).

#### *Evaluación del Crecimiento Celular, Expresión de Proteínas, y Apoptosis en Células MG-63 que Llevan Vectores Retrovirales Químéricos*

Para evaluar los efectos citostáticos de vectores retrovirales que llevan moduladores de ciclo celular, las células que se han transducido con vectores control o vectores que expresan moduladores de ciclo celular se evaluaron para su potencial proliferativo contando el número de células viables en cada cultivo en intervalos seriados (0, 24, 48, 72, 144 y 192 horas) después de la transducción. Se realiza un análisis de Western de expresión de proteína como se ha descrito previamente (Williams, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 268 págs. 8871-8880 (1993); Wu, *et al.*, *Oncol. Reports*, Vol. 2, págs 227-231 (1995)), usando un anticuerpo antipeptídico policlonal que reconoce los 18 aminoácidos del extremo C de la ciclina G1 humana (Wu, *et al.*, 1994). Para analizar la eficacia comparativa de la expresión de G1 antisentido, D1 antisentido y p21 en la inducción de apoptosis en células MG-63, las células se examinaron inicialmente mediante microscopía óptica para cambios morfológicos asociados a apoptosis (contracción celular, citolisis, fragmentación nuclear, y condensación de cromatina). El número relativo de células apoptóticas se confirmó y cuantificó adicionalmente usando el kit de detección de apoptosis *in situ* de Apoptag Plus (Oncor, Githersburg, MD) que detecta específicamente los extremos de ADN 3'-OH nacientes generados mediante fragmentación de ADN mediada por endonucleasa. La significancia de las diferencias entre vectores retrovirales que llevan insertos de aG1, aD1, y p21, y vectores control se determinó mediante análisis de varianza.

#### Resultados

##### *Sarcoma Osteogénico Humano como una Diana para Terapia Génica Usando Vectores Retrovirales*

Los estudios iniciales se dirigieron a la caracterización de la eficacia de transducción de células de osteosarcoma humano, usando la construcción de vector retroviral G1BgSvNa. La eficacia de transducción aparente del vector retroviral era relativamente elevada, aproximándose al 80-90% para las células MG-63 transformadas, en comparación con fibroblastos diploides normales en los que se observaron eficacias de transducción del 20-30%. La Figura 2 muestra la  $\beta$  galactosidasa tiñendo las células MG-63 después de la transducción con el vector *lacZ*. A continuación, se investigaron los efectos citocidas "testigo" potenciales mezclando células transducidas con el gen de la timidinquinasa del Herpes Simplex (HStk) con células no transducidas después de la exposición a  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  de ganciclovir (GCV). La Figura 3 es un gráfico que muestra el grado de confluencia (%) en mezclas de células MG-63 HStk+ y HStk- cultivadas durante 10 días en presencia de GCV ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los cultivos no transducidos que contienen un 100% de células HStk- mostraron un 75% de confluencia. Por el contrario, los cultivos que contienen células 10% Hstk+/90% Hstk- y 30% Hstk+/70% HStk- mostraron solamente un 15% de confluencia, mientras que los cultivos que contiene células de 50% HStk+/50% HStk- consiguieron un 10% de confluencia, y los cultivos con más de 50% de cultivos celulares HStk+ consiguieron <10% de confluencia. La no linealidad de la curva de supervivencia demuestra un efecto testigo significativo de GCV en cultivos mezclados de células MG-63. La elevada eficacia de transducción de vectores retrovirales y la presencia de efectos testigo pronunciados para el tratamiento HStk+/GCV demuestra la fiabilidad de la terapia génica para el sarcoma osteogénico humano usando vectores retrovirales.

##### *Efectos Citostáticos y Citocidas del Vector Retroviral de Ciclina G1 Antisentido en Células de Sarcoma Osteogénico Humano Cultivadas*

La estructura de las construcciones de vector retroviral experimentales se presentan en forma de diagrama en la Figura 4, incluyendo la localización del gen neomicina fosfotransferasa (*neo<sup>r</sup>*) colocado aguas abajo de los respectivos genes para 3 proteínas de control de ciclo celular, dos de las cuales son fragmentos truncados generados mediante ingeniería genética en orientación antisentido. Los tamaños esperados de los transcritos de los vectores de expresión de ciclina G1 antisentido, ciclina D1 antisentido, y p21 son de 3421, 3456 y 3346 pares de bases, respectivamente. La transducción de células MG-63 con cada uno de los vectores de ensayo (Figura 5) mostró una disminución marcada del número de células viables observado entre 24 y 168 horas después de la transducción, en comparación con cultivos transducidos que contienen el vector control que expresa solamente el gen *neo<sup>r</sup>*. Se midieron las densidades celulares, mediante recuento celular, en cultivos de células MG-63 a intervalos seriados después de la transducción con vectores retrovirales que llevan ciclina G1 antisentido (G1aG1), ciclina D1 antisentido (G1aD1), y p21 (G1p21), así como el vector control G1XSvNa (G1X).

Como se muestra en la Figura 6, la expresión comparativa de la proteína ciclina G1 p29 se analizó mediante transferencia de Western, y se observó que disminuyó de forma significativa en células MG-63 que llevan el vector de ciclina G1 antisentido.

##### *La Ciclina G1 Antisentido Knock-out Induce Apoptosis en Células de Sarcoma Osteogénico Humanas*

El aspecto morfológico de células MG-63 se observó mediante microscopía óptica 72 horas después de la transducción de vectores retrovirales que llevan construcciones de vector de ciclina G1 antisentido, ciclina D1 antisentido,



inhibidor p21, y control (Figura 7). Además de disminuciones significativas en las densidades celulares observadas en cultivos transducidos con vectores que contienen construcciones de ciclina G1 antisentido, así como ciclina D1 antisentido y p21 (véase Figura 5), se observó evidencia morfológica de cambios apoptóticos, incluyendo contracción de células, segmentación de núcleo, condensación de cromatina, y fragmentación nuclear (Arends, *et al.*, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, Vol 32, págs. 223-254 (1991); Wyllie, *et al.*, *International Review of Cytology*, vol. 68, págs. 251-306 (1980)), en células transducidas con cada uno de estos elementos de control del ciclo celular. Para investigar adicionalmente el mecanismo de muerte celular, se empleó un enfoque molecular/inmunocitoquímico (Arends, *et al.*, *Amer. J. Pathol.*, Vol. 136, págs. 593-608 (1990); Gavrieli, *et al.*, *J. Cell Biol.*, Vol. 119, págs. 493-501 (1992)) para detectar los fragmentos de escisión de ADN mediados por endonucleasa que son característicos de apoptosis (Bursch, *et al.*, *Biochem. Cell Biol.*, Vol. 68, págs. 1071-1074, (1990); Compton, *Canc. Metast.*, Vol. 11, págs. 105-119 (1992)). La Figura 8 muestra la detección de células apoptóticas mediante análisis inmunocitoquímico de fragmentación de ADN en cultivos que llevan los vectores quiméricos que contienen construcciones de ciclina G1 antisentido, ciclina D1 antisentido, y p21. La inducción de apoptosis en cada uno de los cultivos transducidos con los vectores de control de ciclo celular se determinó como altamente significativa (ciclina G1 antisentido, incidencia media =  $38,8 \pm 5,0\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ; ciclina D1 antisentido, incidencia media =  $37,4 \pm 24,4\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ; y p21, incidencia media =  $37,5 \pm 8,2\%$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ) cuando se compararon con cultivos transducidos con el vector control (incidencia media =  $3,6 \pm 4,1\%$ ,  $n = 6$ ). Estos resultados confirman que los efectos citocidas observados de estos bloqueos del ciclo celular mediados por retrovirus se producen como resultado de la apoptosis.

El sarcoma osteogénico metastásico es una diana para terapias génicas experimentales debido a que se asocia de forma invariable a una evolución fatal. Este tipo de sarcoma tiende a recurrir localmente, dispersarse a otros huesos o a los pulmones, que son sitios accesibles de forma quirúrgica. De hecho, estudios recientes han demostrado tiempo de supervivencia aumentado en pacientes que se han sometido a metastasectomía agresiva (Damron, *et al.*, *Oncology*, Vol. 9, págs. 327-340 (1995)). La seguridad y eficacia de los vectores terapéuticos que llevan enzimas de control de ciclo celular específicas o HStk se pueden evaluar mediante inyección intratumoral de células productoras o sobrenadante de vector en focos metastásicos, seguido de metastasectomía y examen histológico para evidencia de apoptosis, citolisis o citodiferenciación manifiesta. El presente estudio muestra una eficacia de transducción relativamente elevada de células de osteosarcoma MG-63 para los vectores retrovirales que se han mencionado anteriormente en comparación con fibroblastos diploides normales. De forma interesante, la eficacia de transducción aparente de estas células (80-90%) es bastante mayor que el porcentaje de células en fase S en cultivos asincrónicos (Carbonaro-Hall, *et al.*, *Oncogen*, Vol. 8, págs. 1649-1659 (1993)). Las células MG-63 no transducidas mostraron efectos citocidas "testigos" significativos de ganciclovir, cuando se mezclaron con células transducidas HStk+, que, junto con la susceptibilidad a transducción retroviral, demuestra la fiabilidad del desarrollo de enfoques de terapia génica en el manejo clínico de enfermedad metastásica.

Los estudios previos caracterizaron la secuencia precisa de la expresión de ciclina en células de osteosarcoma MG-63 (Wu, *et al.*, *Int. J. Oncol.*, Vol. 3, págs. 859-867 (1993); Carbonaro-Hall, 1993; Hall, *et al.*, *Oncogene*, Vol. 8, págs. 1377-1384 (1993); Williams, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, págs. 8871-8880 (1993), permitiendo la localización temporal de un nuevo punto de bloqueo de ciclo celular asociado a Cdk mediante el agente antiproliferativo rapamicina (Albers, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, págs. 22825-22829 (1993)). Los resultados del presente estudio con vectores retrovirales confirma los resultados de estudios previos usando oligonucleótidos antisentido de penetración (Wu, 1993): que las estrategias antisentido dirigidas contra el locus de ciclina D1 inhiben de forma eficaz la proliferación de células de osteosarcoma. El mecanismo de muerte celular observado en células transducidas con cada una de las construcciones experimentales (es decir, aG1, aD1, y p21) se determinó que era apoptosis, que es de importancia considerable en términos de eficacia terapéutica *in vivo*.

La función fisiológica de ciclina G1 y su potencial terapéutico es de particular interés, debido a que este protooncogen candidato, (CYCG1) se asoció en primer lugar a patogénesis de cáncer en osteosarcomas humanos (Wu, 1994). Además, un estudio reciente sugiere que la ciclina G1, como p21, es una diana transcripcional de la proteína supresora de tumor p53 (Okamoto, *et al.*, *EMBO J.*, Vol. 3, págs. 4816-4822 (1994)). Sin embargo, la hipótesis inicial de que la ciclina G1 puede funcionar en contra de la intuición como una subunidad inhibidora de quinasas dependientes de ciclina en una ruta mediada por p53 para evitar la tumorigénesis se descartó mediante experimentos en los que la sobreexpresión forzada de ciclina G1 no provocó el bloqueo de la ciclina celular ni en líneas celulares normales ni en neoplásicas (Okamoto, 1994). Al contrario, el presente estudio representa la primera demostración de que la ciclina G1 es esencial para la supervivencia y/o el crecimiento de las células de osteosarcoma. Estos nuevos datos respaldan el concepto de que la ciclina G1 está implicada en la activación celular y/o "competencia" (Wu, 1994), y que el bloqueo de la expresión de ciclina G1 mediante construcciones antisentido ejerce importantes efectos citocidas así como citostáticos.

## 60 Ejemplo 2

### *Materiales y métodos*

#### *Sobrenadantes de Vector Retroviral y Líneas Celulares Productoras*

65 Los vectores de expresión de  $\beta$ -galactosidasa y p53 se suministraron amablemente como clones de células de empaquetamiento PA317 de alto título (títulos:  $1,3 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias, ufc/ml para vectores de  $\beta$ -galactosidasa y p53 respectivamente) por Genetic Therapy, Inc. (Gaithersburg, MD). El vector experimental que

## ES 2 288 756 T3

lleva ADNc de ciclina antisentido se empaquetó en células PA317 y se dejó crecer hasta clones de alto título (título de vector:  $1 \times 10^6$  ufc/ml cada uno). Los vectores se denominan G1BgSvNa, G1p53SvNa.7, y G1aG1SvNa para indicar el orden de los promotores y regiones codificantes contenidos en cada vector (vector G1, secuencias de repetición terminal larga (LTR) del virus de la leucemia murina de Moloney; Bg, gen de  $\beta$ -galactosidasa o *lacZ*; p53, gen de supresión tumoral p53; aG1, ciclina G1 humana antisentido, Sv, promotor/potenciador de región temprano SV40; y Na, gen *neo<sup>r</sup>*). La fuente de vector, G1XSvNa, que contiene solamente el gen *neo<sup>r</sup>* controlado por el promotor SV40 se usó como un control para el control de los efectos de la transducción de genes y selección por G418.

El vector G1p53SvNa.7 se construyó a partir de pG1XSvNa y el plásmido pp53. El plásmido pp53 se construyó a partir de pBSK-SN3, obtenido de PharmaGenics (Allendale, Nueva Jersey), que contiene un fragmento de XbaI de 1,8 kb que incluye la fase de lectura abierta de p53 de tipo silvestre así como regiones no traducidas 5' y 3' clonadas en el sitio XbaI de pBluescriptSX (Stratagene, LaJolla, California). El pBSK-SN3 se digirió con SmaI y se digirió parcialmente con NcoI para generar un fragmento de 1.322 pb que contiene la fase de lectura abierta de p53. El fragmento se purificó en gel y se ligó en el plásmido pBg (descrito en la Solicitud PCT publicada N° WO91/10728, publicada el 25 de julio de 1991), en vez del gen de  $\beta$ -galactosidasa entre los sitios NcoI y XhoI para obtener el plásmido pp53.

El plásmido pG1XSvNa se digirió con SnaBI y NotI. Los sitios SnaBI y NotI se localizan en la región poliligador del plásmido. El producto de digestión generó un fragmento que tiene una longitud de 5.848 pares de bases. Los extremos del fragmento se trataron con fosfatasa alcalina intestinal de ternero. El plásmido pp53 se digirió con NotI y SmaI. El producto de digestión generó un fragmento de 2.081 pb y un fragmento de 1.400 pb. El fragmento de 1.400 pb contenía el gen p53. Ese fragmento se aisló y se purificó en gel.

El fragmento de 5.848 pares de bases obtenido de pG1XSvNa, y el fragmento de 1.400 pares de bases obtenido de pp53, teniendo cada fragmento extremos pegajosos/romos, se ligaron para formar pG1p53SvNa. El plásmido resultante se identificó y confirmó mediante varios análisis de restricción diagnósticos. El plásmido pG1p53SvNa se empaquetó después en células PA317 para generar el vector retroviral G1p53SvNa.7. Células, Condiciones de Cultivo Celular y Transducción de Células con Vectores de *lacZ*, ciclina G1 antisentido y p53.

Se cultivaron células de carcinoma (VX2) no diferenciadas de conejo y otras líneas celulares primarias y establecidas con una densidad de cultivo de  $2,5 \times 10^4$  células en cada placa de seis pocillos, en DMEM suplementado con FBS al 10% (D10). Después de la unión durante una noche, las células se expusieron a 1 ml del respectivo vector retroviral en la presencia de Polibreno ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) durante 2 horas, después de lo cual se añadió 1 ml de D10 nuevo a cada pocillo. Cuarenta y ocho horas después de la transducción con el vector *lacZ*, se midió la eficacia de la transferencia génica determinando el porcentaje de células positivas a *lacZ*, después de tinción X-gal y microscopía óptica. Evaluación de Proliferación Celular y Cinética de Ciclo Celular en VX2 Transducidas con Vectores Retrovirales que Llevan Genes de Control de Ciclo Celular.

Para evaluar los efectos citostáticos de vectores retrovirales que llevan moduladores de ciclo celular, las células que se han transducido con vectores control, o vectores que expresan genes de ciclina G1 antisentido o p53, se evaluaron para su potencial proliferativo contando el número de células viables en cada cultivo en intervalos seriados después de la transducción. El efecto de los moduladores del ciclo celular en la cinética del ciclo celular de células VX2 (carcinoma) así como MG-63 (sarcoma) se evaluó mediante análisis FACS. La supervivencia de las células VX2 transducidas en la presencia de G418 también se evaluó para determinar hasta qué alcance la ciclina G1 antisentido era citocida para las células transducidas.

### *Desarrollo de un Modelo Tumoral en Ratones Desnudos Atímicos para Terapia Génica In Vivo Usando Vectores Retrovirales que Llevan Moduladores del Ciclo Celular*

Se dejaron crecer tumores de carcinoma (VX2) no diferenciados de forma exitosa en ratones desnudos mediante implantes subcutáneos de células VX2. Estos tumores crecen rápidamente en tres semanas, y son accesibles quirúrgicamente para la evaluación de cambios en el volumen y morfología del tumor. Brevemente, los tumores VX2 se dejaron crecer durante 5 semanas en ratones desnudos atímicos mediante inyección subcutánea de  $1 \times 10^7$  células VX2. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de  $100 \text{ mm}^3$  se inyectaron en el tumor  $100 \mu\text{l}$  de sobrenadante de vector retroviral concentrado (G1aG1SvNa, que lleva el gen de ciclina G1 antisentido o el vector control G1XSvNa, que solamente lleva el gen *neo<sup>r</sup>*: título de vector  $1 \times 10^8$  ufc/ml), con anestesia de metofano, cada día durante dos semanas. El volumen del tumor se midió cada semana usando un calibrador Vernier, y se estimó el porcentaje de cambio de volumen de tumor. La significancia de las diferencias entre los tumores tratados con el vector de ciclina G1 antisentido y el vector control se evaluó usando el ensayo t de Student. Adicionalmente, los tumores fijados con formalina se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para examen histológico.

### *Resultados*

Se evaluaron una gran diversidad de líneas celulares para sensibilidad a vectores retrovirales que llevan moduladores del ciclo celular. Los resultados de tales ensayos se dan a continuación en la Tabla I.

## ES 2 288 756 T3

TABLA I

*Eficacias de Transducción In Vitro y Efectos Citostáticos de un Vector Retroviral de Ciclina G1 Antisentido en Células Cancerosas y No Cancerosas*

Línea celular	Tipo Celular	Eficacia de Transducción (G1BgSvNa)	Efecto Citostático (G1aG1SvNa)
<b>Cáncer Humano</b>			
MG-63	osteosarcoma	80%	+
HT29	carcinoma de colon	13%	+
Bxpc-3	carcinoma pancreático	9%	+
Miapaca	carcinoma pancreático	19%	+
Mnng/Hos	osteosarcoma	15%	+
EW-1	Sarcoma de Ewing	5%	+
MDA-MB 231	cáncer de pecho	<1%	-
<b>Cáncer no humano</b>			
XC-6 (rata)	osteosarcoma	22%	+
Km12C (rata)	carcinoma de colon	20%	+
Km12C4A (rata)	carcinoma de colon	15%	+
Km12SM (rata)	carcinoma de colon	15%	+
C6 (rata)	glioma	5%	+
VX-2 (conejo)	CA no diferenciado	6%	+
<b>No cáncer humano</b>			
primario	estroma de médula ósea	22%	-
primario	queratocito activado	20%	+
primario	fibroblasto hepático	23%	-
primario	fibroblasto queloide	31%	+
primario	fibroblasto dérmico	24%	+
ECU	endotelial	5%	-
<b>No cáncer No Humano</b>			
A10 (rata)	músculo liso aórtico	45%	+
NIH3T3 (ratón)	fibroblasto	30%	+

De las células ensayadas, se inhibió la proliferación de 4 células de cáncer de colón (HT-29, KM12C4A, KM12C y KM12SM), sarcoma de Ewing (EW-1) glioma C6, 2 de cáncer pancreático (BxPc3, Miapaca) y 2 de osteosarcoma (MG-63, MnngHOS) mediante el vector retroviral de ciclina G1 antisentido. Las células HT29, BxPc3, y KM12SM también eran sensibles a p53 de tipo silvestre. Entre las líneas celulares no cancerosas, la citostasis se indujo mediante ciclina G1 antisentido y p53 en células de músculo liso aórtico de embrión de rata y fibroblastos humanos de piel y queloides, pero no en fibroblastos humanos normales de estroma, humanos derivados de hígado o células endoteliales humanas.

Se usó el análisis FACS para investigar el efecto del vector retroviral de ciclina G1 antisentido en la cinética de ciclo celular de células tumorales sarcomatosas y carcinomatosas. Las células de carcinoma no diferenciadas VX2 transducidas con vectores retrovirales que llevan ciclina G1 antisentido mostraron profundas alteraciones de la cinética del ciclo celular después del análisis FACS, mostrando un ensanchamiento de los picos que es indicativo de fragmentación nuclear y una disminución de células en fase S (Figura 9A). En comparación, el análisis FACS de células MG-63 transducidas con el vector de ciclina G1 antisentido mostró acumulación de células en fase G1, y una disminución significativa en el número de células en fase S, sugiriendo que el mecanismo de citostasis en estas células transducidas acompaña al bloqueo del ciclo celular en fase G1 (Figura 9B).

De forma simultánea con la cinética del ciclo celular alterada, la ciclina G1 antisentido así como los vectores de p53 inhibieron la proliferación de células de carcinoma VX2 durante 144 horas en comparación con células tratadas con vector control (Figura 10). Después de la selección de células transducidas con G418, solamente se eliminaron un 5% de las células VX2 (Figura 11), indicando que la amplia mayoría de las células que llevan ciclina G1 antisentido y p53 de tipo silvestres han sufrido muerte celular, presumiblemente mediante apoptosis. Estos datos representan la primera demostración *in vitro* de que la ciclina G1 antisentido puede presentar actividad antitumoral en cánceres de origen epitelial.

La Figura 12 muestra la inhibición del crecimiento tumoral de VX2 en ratones desnudos mediante inyección intratumoral de un vector retroviral que lleva ciclina G1 antisentido (G1aG1) en comparación con el crecimiento de tumores VX2 en ratones que reciben el vector control (G1X;  $p < 0,05$  a los 7 días;  $p < 0,001$  a los 11 días; y  $p < 0,05$  a los 21 días;  $n = 3$  ratones en cada grupo). En 1 de cada 5 ratones tratados con el vector de ciclina antisentido se observó una disminución del 12% del tamaño tumoral una semana después del tratamiento. Por el contrario, el crecimiento tumoral no se detuvo en los ratones tratados con el vector control.

Los ratones tratados con el vector de ciclina G1 antisentido mostraron tumores bastante más pequeños que los ratones de control. La Figura 13A muestra ratones representativos tratados ciclina G1 antisentido frente a tratados con vector control mientras que la Figura 13B muestra las características histopatológicas de secciones de tumor VX2 fijadas con formalina y teñidas con H&E, recogidas a los 21 días (una semana después de completar el tratamiento). Las secciones de tumores que se trataron con el vector control mostraron áreas de densidad celular aumentada con células con forma de huso anaplásicas y numerosas figuras mitóticas. Por el contrario, las secciones de los tumores que se trataron con el vector de ciclina G1 antisentido mostraron áreas de densidad celular disminuida con menos figuras mitóticas y notable infiltración celular mononuclear. Sin embargo, se observaron células tumorales residuales en secciones de tumor que recibieron el vector de ciclina G1 antisentido, indicando que una población de células tumorales no se transdujo de forma eficaz. En conjunto, el vector retroviral que expresa la ciclina G1 antisentido parece mostrar efectos antitumorales *in vivo* en este modelo tumoral de carcinoma no diferenciado.

#### Discusión

El cáncer es una diana principal para terapia génica debido a que los pacientes con cáncer, particularmente aquellos con enfermedad metastásica, a menudo tienen pocas o ninguna opción de tratamiento y serían adecuados para terapias experimentales. El sistema de suministro de vector retroviral se ha usado en 76 de los 106 ensayos humanos aprobados. Este sistema de vector utiliza un retrovirus de ratón incapaz de replicación, y por lo tanto, su uso, *ex vivo* e *in vivo*, no ha provocado ningún efecto secundario principal.

Otras estrategias de terapia génica incluyen 1) potenciación de la respuesta inmune mediante inyección de vacunas de tumor que contienen células tumorales irradiadas transducidas que expresan genes de citoquinas, CMH clase 1 o B7, 2) expresión reforzada de genes supresores de tumores, 3) knock-out de sobreexpresión de protooncogenes mediante vectores antisentido, y 4) expresión reforzada de genes de receptor de factor de crecimiento. En años recientes, la sobreexpresión o amplificación de diversos genes de control del ciclo celular se ha observado en diversos trastornos malignos, indicando que el knock-out antisentido de estos genes sobreexpresados se podría usar para reestablecer el control de la proliferación celular, inducir la citostasis, inhibir el crecimiento tumoral y disminuir la carga tumoral.

Esos conceptos surgen de estudios iniciales de la levadura *S. cerevisiae* en gemación donde las señales extracelulares que modulan el crecimiento y la diferenciación actúan mediante la regulación de un punto de control de G1 denominado START (Hartwell, *Science*, Vol. 183, págs. 46-51 (1974); Cross *et al.*, *Ann. Rev. Cell. Biol.*, Vol. 5, págs. 341-395, (1989)), que es ligeramente análogo al punto de restricción de G1 (punto R) observado en células animales en cultivo (Pardee, *Science*, Vol. 246, págs. 603-608, (1989)). Por lo tanto, la observación de que las ciclinas G1 (Clns) en *S. cerevisiae*, en asociación con una subunidad de Cdk (Cdc28), se requieren por las células para pasar el START condujeron a la hipótesis de que las ciclinas específicas G1 pueden de hecho funcionar como componentes aguas arriba del Factor de Promoción de fase S de mamífero (Draetta, *Trends Biochem. Sci.*, Vol. 15, págs. 378-383 (1990); Reed, *Trends in Genetics*, Vol. 7, págs. 95-99 (1991)). La exploración de bibliotecas de ADNc humano para genes que podrían servir para rescatar células de levadura deficientes en Cln condujeron a la identificación y clonación molecular de tres nuevas familias de ciclinas G1 humanas (ciclinas C, D y E: Lew *et al.*, *Cell*, Vol. 66, págs. 1197-1206, (1991); Koff *et al.*, *Cell*, Vol. 66, págs. 1217-1288 (1991); Xiong *et al.*, *Cell*, Vol. 65, págs. 691-699 (1991); Sherr, *Cell*, Vol. 73, págs. 1059-1065, (1993)). Estudios posteriores han mapeado el gen PRAD1/Ciclina D1 hasta el cromosoma 11q13, implicando la ciclina D1 como el oncogen BCL-1 que se transloca y se sobreexpresa en neoplasmas de células B (Rosenberg *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 88, pág. 9683 (1991); Withers *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 11, pág. 4846 (1991)) y como el oncogen 11q13 que se amplifica y sobreexpresa en cánceres de células escamosas, de pecho, esofágico y de vejiga (Lammie *et al.*, *Oncogene*, Vol. 6, pág. 439 (1991); Jiang *et al.*, *Cancer Res.*, Vol. 52, pág. 2980 (1992), Motokura *et al.*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Vol. 3, pág. 5 (1993)). La amplificación genética, expresión aumentada y metabolismo alterado de la ciclina E también se ha observado en células de cáncer humano (Buckley *et al.*, *Oncogene*, Vol. 8, pág. 2127 (1993); Keyomarsi *et al.*, *Cancer Res.*, Vol. 54, pág. 380 (1994)). Mas recientemente, se aisló una ciclina de tipo G humana, una ciclina G1 que se sobreexpresaba de forma marcada en un subconjunto de células de osteosarcoma (Wu *et al.*, 1994). Tomadas en conjunto, estas observaciones afirman que la expresión constitutiva, ectópica o no regulada de ciclinas G1, que normalmente señalizan vías de transducción a la maquinaria enzimática del ciclo celular (Hunter y Pines, *Cell*, Vol. 66, págs. 1071-1074 (1991); Sherr, (1993)), puede jugar un papel importante en la transformación neoplásica y tumorigénesis (Hunter y Pines, *Cell*, Vol. 79, págs. 573-

382 (1994)), y se podría usar como puntos de control estratégicos para el desarrollo de nuevos enfoques de terapia génica para trastornos de cáncer e hipoproliferativos.

En este estudio, la seguridad y eficacia de un sobrenadante de vector retroviral de ciclina G1 antisentido se ensayó como un enfoque de terapia génica potencial para cáncer. Una amplia diversidad de células cancerosas mostró una gran sensibilidad a ciclina G1 knock-out antisentido en comparación con p53 de tipo silvestre. La proliferación de algunas células no cancerosas también se inhibió mediante el vector de ciclina G1 antisentido, sugiriendo también su utilidad potencial en el manejo de trastornos fibroproliferativos no malignos. Por tanto, diversos tipos celulares mostraron sensibilidad diferencial a moduladores del ciclo celular. El vector de ciclina G1 antisentido tenía efectos profundos en la cinética del ciclo celular en células tumorales carcinomatosas y sarcomatosas, con un efecto neto de síntesis de ADN disminuida, como se evidencia mediante una disminución de células en fase S. Estos datos sugieren que el mecanismo de citostasis en estas células transducidas acompaña a un bloqueo del ciclo celular en fase G1. Después de la selección de células transducidas con G418, solamente se eliminaron un 5% de las células VX2, indicando que la amplia mayoría de las células que llevan ciclina G1 antisentido y p53 de tipo silvestre ha sufrido muerte celular, presumiblemente mediante apoptosis.

Finalmente, el crecimiento tumoral *in vivo* se inhibió de forma espectacular mediante inyección intratumoral sucesiva de un sobrenadante de vector retroviral de ciclina G1 antisentido concentrado. Por el contrario, el crecimiento tumoral no se detuvo en los ratones tratados con el vector control. El examen histológico de los tumores una semana después del cese del tratamiento mostró áreas de densidad celular aumentada con células con forma de huso anaplásicas y numerosas figuras mitóticas en los tumores tratados con vector control. Por el contrario, las secciones de tumores que se trataron con el vector de ciclina G1 antisentido mostraron áreas de densidad celular disminuida con menos figuras mitóticas y notable infiltración celular mononuclear. Tomadas en conjunto, estas observaciones representan la primera demostración de la actividad antitumoral *in vivo* de un vector retroviral que expresa ciclina G1 antisentido en un modelo de carcinoma no diferenciado.

### Ejemplo 3

#### *Inhibición de Crecimiento Tumoral In Vivo mediante un Vector Retroviral que Lleva Ciclina G1 Antisentido en Ratones Desnudos Atómicos*

Los tumores de osteosarcoma se dejaron crecer durante dos semanas en ratones desnudos atómicos mediante inyección subcutánea de  $1 \times 10^7$  células MNNG/HOS. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de  $100 \text{ mm}^3$ , se inyectaron por vía intratumoral  $100 \mu\text{l}$  de sobrenadante de vector retroviral concentrado (vector control G1XSvNa, que lleva solamente el gen neo<sup>R</sup>, o G1aG1SvNa, que lleva el gen de ciclina antisentido: títulos de vector: cada uno  $1 \times 10^8$  ufc/ml) cada diez días durante 10 días.

El volumen del tumor se midió a intervalos de 0, 4, 6, 8, 10 y 12 días después de la inyección del vector. La Figura 14 muestra el volumen del tumor en cada uno de los intervalos que se han mencionado anteriormente. Como se muestra en la Figura 14, los ratones tratados con el vector de ciclina G1 antisentido tienen un tumor menor que los ratones tratados con el vector control.

La tinción hematoxilina y eosina de secciones de tumor MNNG/HOS fijadas con formalina durante dos días después del tratamiento con los vectores retrovirales que llevan el gen de ciclina G1 antisentido (G1aG1SvNa) o el vector control (G1XSvNa) muestra un índice mitótico disminuido (un 1% para tumores tratados con ciclina G1 antisentido frente a un 3,5% para tumores tratados con vector control), y formación de estroma aumentada.

El análisis FACS de núcleos teñidos con PI obtenidos de tumores MNNG/HOS mostró una disminución espectacular en el número de células aneuploides en los tumores tratados con vector de ciclina G1 antisentido (2%) en comparación con los tumores tratados con el vector control (45%). Adicionalmente, la población diploide de células de los tumores tratados con el vector de ciclina G1 antisentido mostró un 77% de acumulación de células en fase G1 frente a un 49% en los tumores tratados con el vector control G1XSvNa, y una disminución significativa del número de células en fase S (un 15% frente a un 25%), lo que sugiere que el mecanismo de citostasis en los tumores transducidos se acompaña por un bloqueo de ciclo celular en fase G1.

### Ejemplo 4

#### *Materiales y métodos*

##### *Vectores Retrovirales, Sobrenadantes de Vector y Líneas Celulares Productoras*

La secuencia de ADNc que codifica la ciclina G1 humana (Nº de entrada X777794) es como se describe originalmente por Wu *et al.*, 1994. El vector experimental que lleva el ADNc de ciclina G1 antisentido (Wu, *et al.*, 1994) se empaquetó en células PA317 y se dejó crecer hasta clones de alto título (título de vector:  $1 \times 10^6$  ufc/ml cada uno). Los vectores de expresión de  $\beta$ -galactosidasa y p53 se suministraron amablemente como clones de células de empaquetamiento PA317 de alto título (título:  $5 \times 10^5$  y  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias, ufc/ml para vectores de  $\beta$ -galactosidasa y p53 respectivamente) por Genetic Therapy, Inc. (Gaithersburg, MD). Los vectores se denominan G1nBgSvNa (descrito en las Solicitudes PCT Nº WO95/19427, publicada el 20 de julio de 1995 y WO96/22212,

publicada el 25 de julio de 1996), G1p53SvNa.7, y G1aG1SvNa para indicar el orden de los promotores y regiones codificantes contenidos en cada vector (G1, secuencias de repetición terminal larga (LTR) del virus de la leucemia murina de Moloney; Bg, gen de  $\beta$ -galactosidasa, p53, gen de supresor de tumor p53; aG1, ciclina G1 antisentido humana; Sv, promotor/región potenciadora temprano SV40; y Na, gen *neo<sup>r</sup>*). Los sobrenadantes de vector retroviral se concentran adicionalmente hasta un título de  $1 \times 10^8$  ufc/ml mediante centrifugación a baja velocidad. La estructura del vector, G1XSvNa, que contiene solamente el gen *neo<sup>r</sup>* controlado por el promotor SV40 se usa como un control para los efectos de la transducción y selección por G418.

#### Células, Condiciones de Cultivo Celular, y Transducción con Vectores Retrovirales

Se obtuvieron células de músculo liso aórtico de rata (A10) de ATCC (N° de catálogo CRL1476) y se mantuvieron como monocapas con una densidad de cultivo de  $2,5 \times 10^4$  células por pocillo, en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS; D10). Después de la unión durante una noche, las células se expusieron a 1 ml del respectivo vector retroviral en la presencia de Polibreno ( $8 \mu\text{g/ml}$ ) durante dos horas, con balanceo periódico, después de lo cual se añadió 1 ml de D10 nuevo a cada pocillo. Cuarenta y ocho horas después de la transducción con el vector de  $\beta$ -galactosidasa, se midió la eficacia de transferencia génica por determinación del porcentaje de células positivas a  $\beta$ -galactosidasa, después de la exposición a tinción X-gal ( $\beta$ -galactosidasa) como se describe en Lal *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.*, Vol. 42, págs. 953-956 (1994), y visualización mediante microscopía óptica.

#### Análisis de Proliferación Celular, Síntesis de ADN, Expresión de Proteína Ciclina G1 y Apoptosis

Para evaluar los efectos citostáticos de vectores retrovirales que llevan moduladores del ciclo celular, las SMC que se han transducido con vectores control o vectores que expresan gen(es) de ciclina G1 antisentido (o p53) se evaluaron para su potencial proliferativo contando el número de células viables en cada cultivo a intervalos seriados después de la transducción. Los valores mostrados representan la media del triplicado  $\pm$  desviación típica (D.T.). El efecto de los moduladores del ciclo celular en la síntesis del ADN se controló mediante la incorporación de timidina- $\text{H}^3$  en el ADN como se describe en Gordon, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 93, págs. 2174-2179 (1996). Brevemente, 24 horas después de la transducción con el vector de ciclina G1 antisentido o control, los cultivos celulares se expusieron a timidina- $\text{H}^3$  ( $1 \mu\text{Ci}$  por pocillo; actividad específica,  $6,7 \text{ Ci/mmol}$ ;  $1 \text{ Ci}=37 \text{ GBq}$ ; New England Nuclear) durante 2 horas. Las células se pusieron después en hielo, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y después se lavaron tres veces con ácido tricloroacético (TCA) al 5% enfriado con hielo. El lavado de TCA final se retiró y el material precipitado por TCA se solubilizó con  $0,2 \text{ ml}$  de hidróxido sódico  $1 \text{ M}$  seguido por neutralización con un volumen igual de ácido acético  $1 \text{ M}$ . Se midió la incorporación de timidina- $\text{H}^3$  en macromoléculas celulares mediante recuento por escintilación líquida y se expresó como unidades de radioactividad en dpm/pocillo. La significancia de las diferencias entre los grupos no-tratados y tratados con vector se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA).

Se realizó el análisis de Transferencia de Western de la expresión de ciclina como se describe en Wu *et al.*, *Int. J. Oncol.* Vol. 3, págs. 859-867 (1993) y Colton, *Statistics in Medicine*, pág. 99, Little, Brown & Co. (1974), usando un anticuerpo antipeptido policlonal que reconoce los 18 aminoácidos C-terminales de la ciclina G1 humana (Wu *et al.* 1994). La aparición de apoptosis en cultivos celulares transducidos se evaluó con el kit de detección Apoptag Plus (Oncor), que detecta los extremos de ADN  $3'-\text{OH}$  nacientes generados mediante fragmentación de ADN mediada por endonucleasa utilizando adición enzimática (transferasa desoxinucleotidil terminal, (TdT) de nucleótidos marcados con digoxigenina seguida de detección inmunocitoquímica de los fragmentos de ADN modificados (Skotzko, *et al. Cancer Res.*, Vol. 55, págs. 5493-5498 (1995)).

#### Transferencia mediada por Retrovirus del Gen de Ciclina G1 Antisentido en un Modelo de Lesión de Carótida de Rata de Reestenosis Vascular

Bajo anestesia general (ketamina,  $10 \text{ mg/kg}$ ; Rompún  $5 \text{ mg/kg}$ ) de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales (IACUC) de la USC, se usó un catéter de embolectomía arterial 2F Intimax (Applies Medical Resources Corp., Laguna Hills CA) para exponer el endotelio de la arteria carótida de ratas Wistar (pesando cada una  $400\text{-}500 \text{ g}$ ). El catéter se insertó en la arteria carótida externa que se ligó distalmente, y se pasó a la arteria carótida común. El balón se infló hasta un volumen de  $10 \mu\text{l}$  y se pasó tres veces a lo largo de la longitud de la arteria carótida común. Después de la lesión por balón, se retiró el catéter de embolectomía y se ligó la arteria carótida interna de forma transitoria justo distalmente a la bifurcación. La mitad distal del segmento lesionado se ligó del mismo modo de forma transitoria, y después se expuso a los vectores retrovirales durante 15 minutos. Cada grupo de animales recibió una infusión de  $100 \mu\text{l}$  de vector de ciclina G1 antisentido de alto título concentrado ( $n=7$ ) o un vector control que lleva solamente el gen *neo<sup>r</sup>* ( $n=4$ ), después de lo cual se permitió a las ratas que se recuperaran, y se alimentaron con una dieta normal de ratón/rata y agua *ad libitum*. Por propósitos de analgesia, a los animales se les dio buprenex  $0,2 \text{ mg/kg s.c.}$  cada 12 horas durante 72 horas después de la operación. Las ratas se sacrificaron 2 semanas después de la inducción de la lesión vascular mediante una sobredosis de pentobarbital sódico ( $120 \text{ mg/kg IM}$ ), y secciones fijadas con formalina de arterias carótidas contralaterales lesionadas y no lesionadas se tiñeron con hematoxilina-eosina, tinción de elastina de Verhoeff rojo Siris. Las secciones histológicas se observaron mediante microscopía óptica y se realizó la evaluación morfométrica de las áreas superficiales de la neoíntima frente a la media usando un sistema digitalizado; la extensión de la hiperplasia de la íntima después de la lesión vascular se expresa como proporción de neoíntima a media. La significancia de las diferencias de las proporciones de la neoíntima a la media de vasos no tratados o tratados con vector se determinó mediante ensayo t por pares (Colton, 1974).

*Resultados**Transducción de SMC Aórticas con Vectores Retrovirales que Llevan Genes de Control del Ciclo Celular*

5 Usando un vector de  $\beta$ -galactosidasa dirigido al núcleo (G1nBgSvNa), la eficacia de transducción aparente de SMC aórticas de rata (A10) era aproximadamente un 45% (Figura 15A), lo que era similar a células NIH3T3 de ratón, y ligeramente mayor que fibroblastos normales humanos o fibroblastos derivados de cicatriz (queloides) en los que se observaron eficacias de transducción de respectivamente 20% y 30%. La transducción de SMC aórticas con vectores que llevan ciclina G1 antisentido (aG1) mostraron un descenso marcado del número de células viables observado entre 10 24 a 144 horas después de la transducción en comparación con cultivos transducidos que contienen el vector vacío (control) (Figura 15B). El análisis de Transferencia de Western confirmó la regulación negativa de la expresión de la proteína ciclina G1 en SMC aórticas transducidas con ciclina G1 antisentido en comparación con el vector control (no mostrado). La proliferación de células A10 también se inhibió por sobreexpresión mediada por retrovirus del gen supresor de tumores p53 en la orientación con sentido. Los vectores de ciclina G1 antisentido y p53 inhibieron la progresión del ciclo celular, como se determinó mediante la incorporación de timidina- $H^3$  ( $p < 0,001$  para aG1 y p53; 15 Figura 15C).

*La Ciclina G1 Antisentido Induce Degeneración, Formación de Sincitios Multicelulares y Apoptosis en SMC Aórticas*

20 Las microfotografías mostradas en la Figura 16 muestran el aspecto morfológico de SMC aórticas observadas mediante microscopía óptica 24 horas después de la transducción con vectores retrovirales control y de ciclina G1 antisentido. Como se muestra en la Figura 16A, las células transducidas con el vector control no mostraron cambios morfológicos significativos. Por el contrario, se observó una disminución significativa de la densidad celular en cultivos 25 transducidos con vectores que llevan ciclina G1 antisentido, asociada a cambios degenerativos abiertos, formación de sincitio multinuclear aumentada, y citolisis (Figuras 16B, 16C, 16D). De forma importante, la proporción de células implicadas en los sincitios sobrepasó en gran medida la eficacia de transducción como se determina por la transducción y expresión de  $\beta$ -galactosidasa. La formación de sincitio sucede en cultivos A10 transducidos con los sobrenadantes de vector de ciclina G1 antisentido derivado de tres clones de alto título diferentes, así como el vector p53 en cierto 30 grado, pero no en los vectores control (G1XSvNa) o  $\beta$ -galactosidasa. Para investigar adicionalmente los mecanismos de muerte celular, se empleó un enfoque molecular e inmunocitoquímico para detectar los fragmentos de escisión de ADN mediados por endonucleasa que son característicos de apoptosis. Como se muestra en las Figuras 16E y 16F, no se observó evidencia de apoptosis en células transducidas con el vector control (Figura 16E); sin embargo, se observaron varias células apoptóticas en los cultivos transducidos con el vector de ciclina G1 antisentido (Figura 35 16F). Estos resultados indican que los efectos citocidas del vector de ciclina G1 antisentido en SMC aórticas A10 son resultado en parte de apoptosis, degeneración celular y formación de sincitio aberrante.

*Evidencia de un Efecto “Testigo” Citocida en Cultivos de SMC Aórticas Transducidos con Vectores Retrovirales de Ciclina G1 Antisentido*

40 Para confirmar que las células no transducidas se han incorporado en los sincitios multicelulares observados en los cultivos transducidos con ciclina G1 antisentido, se cargan células A10 no transducidas con un marcador fluorescente y se superponen las células marcadas a cultivos transducidos previamente dos horas después de enjuagar el sobrenadante de vector. La incorporación de células de músculo liso A10 no transducidas marcadas de forma fluorescente en sincitios multinucleares era evidente cuando estas células marcadas se superpusieron sobre cultivos A10 45 transducidos previamente (Figuras 17A y 17B, bajo aumento; 17C y 17D, alto aumento; 17A y 17C, contraste de fase; 17B y 17D, luz UV). Un sincitio multinuclear representativo que incorpora células que contienen la marca fluorescente se identifica mediante la flecha. Veinticuatro horas después del co-cultivo con SMC aórticas no transducidas marcadas de forma fluorescente, un número considerable de los sincitios multinucleados también se marcaron con el 50 colorante fluorescente, indicando que ha sucedido la fusión celular entre las células transducidas y no transducidas. Estas observaciones proporcionan evidencia adicional de un nuevo “efecto testigo” citocida que se puede distinguir del clásico “efecto testigo” inducido por el sistema de timidinquinasa del Virus Herpes Simplex/ganciclovir y mediado por uniones comunicantes presentes en las células susceptibles.

55 La fenomenología de la fusión celular se siguió a lo largo del tiempo (Figura 17E, mostrando un aumento significativo del número de sincitios que aumentó durante 4-8 horas en SMC aórticas que se han transducido con el vector de ciclina G1 antisentido (G1aG1SvNa), cuando se compararon con las células transducidas con el vector control (G1XSvNA,  $p < 0,001$ ). También se observó un grado apreciable de formación de sincitio en células que se habían transducido con el vector de p53 de tipo silvestre (G1p53SvNA) que también produjo citostasis marcada en células 60 A10. Sin embargo, el número de sincitios observados en células transducidas con p53 era significativamente menor que el observado en células transducidas con aG1 a las 8, 12, 24 horas ( $p < 0,001$ ).

*El Vector de Ciclina G1 Antisentido Inhibe la Proliferación y Migración de Células de Músculo Liso Aórticas en un Modelo de Lesión “Tisular” In Vitro*

65 Se pueden estimular cultivos de SMC A10 de monocapa de alta densidad (confluentes) que muestran inhibición por contacto de crecimiento celular para proliferar a lo largo de un tramo de alteración celular/tisular que muestra una respuesta de “curación de la herida” característica durante un periodo de 7 días. La Figura 18A muestra cultivos de

alta densidad de SMC aórticas raspadas con una punta de pipeta de 200  $\mu$ l para crear un tramo de 1 mm desprovisto de células. La Figura 18B muestra el aspecto del margen “herido” inmediatamente después del raspado y lavado para retirar las células desprendidas. Como se muestra en la Figura 18C, la transducción posterior de los cultivos celulares (a t= 24 horas) con un vector de  $\beta$ -galactosidasa dirigido al núcleo era mayor en los márgenes de la “herida”, un área de proliferación de SMC activada. La Figura 18D muestra la proliferación y migración de SMC aórticas al tramo de herida en t= 24 horas después de la lesión. Por el contrario, se observaron cambios apoptóticos y otros cambios degenerativos en las SMC que se transdujeron con el vector de ciclina G1 antisentido (Figura 18E). De forma notable, estos cambios degenerativos se marcaron mediante formación de sincitios multicelulares que no se observaron en el vector control o de  $\beta$ -galactosidasa. Adicionalmente, la proliferación celular y migración celular manifiesta al tramo de herida disminuyó de forma marcada en los cultivos celulares transducidos con ciclina G1 antisentido, evidenciado por el cierre retardado del tramo de herida (aproximadamente 7 días) en comparación con los cultivos tratados con el vector control (aproximadamente 3 días).

#### 15 *Inhibición de la Formación de Neoíntima In Vivo mediante Infusión de Sobrenadante de Vector de Ciclina G1 Antisentido de Alto Título*

Estudios previos han demostrado la transferencia directa de genes marcadores recombinantes en la pared arterial mediante vectores retrovirales con títulos virales de  $10^4$ - $10^6$  partículas/ml (Nabel, *et al.*, *Science*, Vol. 249, págs. 1285-1288 (1990), y varios estudios han demostrado la eficacia de la terapias génicas citostáticas suministradas por otros métodos en modelos animales de reestenosis vascular. En este estudio, se generaron sobrenadantes de vector retroviral de alto título (título viral:  $1 \times 10^8$  ufc/ml) para ensayar la eficacia de ciclina G1 antisentido suministrada por vectores retrovirales altamente concentrados en el modelo de lesión de carótida de rata de reestenosis. El examen histológico de las secciones teñidas obtenidas de arterias no tratadas lesionadas por balón mostraron formación sustancial de neoíntima a las 2 semanas; como se evidencia mediante la invasión de la túnica íntima por SMC vasculares en proliferación (Figuras 19A y 19C). Por el contrario, los segmentos arteriales lesionados que se trataron con los sobrenadantes de vector de ciclina G1 antisentido de alto título mostraron una disminución significativa de la formación de neoíntima (Figuras 19B y 19D). El análisis morfométrico confirmó inhibición significativa de la formación de neoíntima en arterias carótidas lesionadas que se trataron con el vector retroviral de ciclina G1 antisentido (proporción I:M  $0,4 \pm$  D.T. 0,4) en comparación con los segmentos arteriales no tratados (proporción I:M  $1,1 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 19G). En estudios de control, no había diferencia entre el alcance de la formación de neoíntima en segmentos arteriales no tratados (proporción I:M  $1,3 \pm$  D.T. 0,5) en comparación con vectores de alto título que contienen solamente el gen neo<sup>r</sup> (proporción I:M  $1,5 \pm 0,2$ ).

#### 35 *Discusión*

Los ensayos clínicos basados en el bloqueo molecular de factores de crecimiento identificados y/o receptores del factor de crecimiento implicados en la patogénesis de la hiperplasia de la íntima no se han demostrado como vehículos eficaces para terapia vascular citostática (Faxon, *et al.* *J. Amer. Coll. Cardiol.*, Vol. 25, págs. 362-369 (1995)). Por tanto, se ha sugerido que los enfoques que dirigen a las cascadas de señalización intracelular que son compartidas por muchas moléculas de regulación del crecimiento pueden ser más estratégicos (Gibbons, *et al.*, *Science*, Vol. 272, págs. 689-693 (1996)). En consecuencia, los nuevos enfoques de terapia génica para inhibir la proliferación de SMC y la formación de neoíntima se han centrado recientemente en los mecanismos de control del ciclo celular. De hecho, los enfoques antisentido contra genes reguladores del ciclo celular se han demostrado como marcadamente eficaces para limitar la hiperplasia de la neoíntima en modelos animales de formación de lesión después de cirugía de derivación (Mann, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 92, págs. 4502-4506 (1996)) y angioplastia de balón. Un único suministro intraluminal de quinasa Cdc2 antisentido o quinasa Cdk2 produjo inhibición significativa de la hiperplasia de la neoíntima (Morishita, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 90, págs. 8474-8478 (1993); Morishita, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, Vol. 93, págs. 1458-1464 (1994), Abe, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 198, págs. 16-24 (1994)). También se demostró que un vector adenoviral que lleva una forma no fosforilable, constitutivamente activa de Rb inhibía la proliferación de SMC y formación de neoíntima después de la angioplastia de balón. (Chang, *et al.*, *Science*, Vol. 267, págs. 518-522 (1995)). También se han desarrollado estrategias moleculares dirigidas contra E2F, ya que la inducción coordinada de numerosos genes reguladores del ciclo celular se regula mediante este factor de transcripción. Los oligonucleótidos que contienen la secuencia del elemento cis E2F funcionan como “señuelos” que unen E2F en la célula e inhiben la formación de la lesión de la neoíntima *in vivo* (Morishita, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 92, págs. 5855-5859 (1995)). Se proporciona un respaldo adicional del concepto de que la terapia génica citostática basada en la inhibición de enzimas de control del ciclo celular mediante observaciones recientes de que la rapamicina, que inhibe la activación de las enzimas del ciclo/división celular (Albers, *et al.*, *Ann. New York Acad. Sci.*, Vol. 696, págs. 54-62 (1993); Albers, *et al.*, *J. Biol. Chem.* Vol. 268, págs. 22825-22829 (1993); Jayaraman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, Vol. 34, págs. 25385-25388 (1993), también inhibe la formación de lesión vascular en modelos de rata y de cerdo (Gregory, *et al.*, *Transplantation*, Vol. 59, págs. 655-661 (1995); Marx *et al.*, *Circ. Res.*, Vol. 76, págs. 412-417 (1995)).

La ciclina G1 es un miembro de la denominada familia G1 de ciclinas que actúan junto con proteínquinatas dependientes de ciclina durante la fase G1 del ciclo celular (Wu, *et al.*, *Int. J. Oncol.*, Vol. 3, págs. 859-867 (1993); Sherr, *Cell*, Vol. 79, págs. 551-555 (1994)). Inducida en G1 temprana y sospechosa de participar en los mecanismos moleculares de activación celular (Wu *et al.*, *Oncol. Reports*, Vol. 1, págs. 705-711 (1994)), la ciclina G1 parece ser una diana transcripcional del gen supresor de tumores p53 (Okamoto, *et al.*, *EMBO J.*, Vol. 13, págs. 4816-4822 (1994)). La sobreexpresión de ciclina G1 se asoció en primer lugar a cáncer (Wu, *et al.*, 1994) y más recientemente, se



demonstró que la regulación negativa de la expresión de la ciclina G1 mediante vectores retrovirales que llevan *CYCG1* antisentido inhibe el crecimiento y supervivencia de células de osteosarcoma (MG-63) humano (Skotzko, *et al.*, 1995).

5 En este ejemplo, se examinan los efectos de vectores retrovirales que llevan una construcción de ciclina G1 anti-  
sentido en la proliferación de células de músculo liso aórtico de rata A10. Los vectores retrovirales que llevan el gen  
de ciclina G1 antisentido, así como el gen p53, en orientación con sentido, inhibieron la supervivencia y proliferación  
de células A10 transducidas en cultivos de 2-6 días. La citostasis se asoció a síntesis de ADN disminuida y regulación  
negativa de ciclina G1 en SMC vasculares transducidas con el vector de ciclina G1 antisentido en comparación con  
aquellas transducidas con el vector control. El examen morfológico de SMC transducidas mostró citolisis, formación  
10 de sincitios gigantes, y cambios apoptóticos manifiestos evidenciados mediante contracción celular, fragmentación  
de núcleo y condensación de cromatina observadas en células A10 transducidas con vector de ciclina G1 antisenti-  
do y vector p53. Sin embargo, el número de sincitios multinucleares se observó como significativamente mayor en  
los cultivos celulares tratados con el vector de ciclina G1 antisentido. Se observaron efectos “testigo” pronunciados  
en células A10 transducidas con el vector de ciclina G1 antisentido como se determinó mediante ensayos de fusión  
15 celular cuantitativos y el marcado fluorescente de células no transducidas. Estas observaciones indican que el vector  
de ciclina G1 antisentido induce un “factor de promoción de fusión”, posiblemente una proteasa o glicosilasa que  
facilita la fusión celular y formación de sincitios, posiblemente mediante mecanismos de aumento relacionados con  
las propiedades fusogénicas de la proteína de envuelta MoMuLV (Jones, *et al.*, *J. Virol.*, Vol. 67, págs. 67-74 (1993)).

20 Las terapias génicas citostáticas para reestenosis muestran las promesas de consecuencias terapéuticas adicionales  
porque la inhibición de los genes reguladores del ciclo celular se demuestra que desencadena apoptosis celular vascular  
(Gibbons, *et al.*, 1996; Laird, *et al.*, *Circulation*, Vol. 93, págs. 529-536 (1996)). En SMC activadas de forma mitótica,  
como en células de osteosarcoma (Skotzko, *et al.*, 1995), la citotoxicidad del bloqueo de ciclina G1 se puede atribuir, al  
menos en parte, a la activación de una ruta apoptótica (Figura 16F). Además, la inducción del bloqueo del ciclo celular  
25 en algunas circunstancias también parece que inhibe la migración de SMC y producción de matriz extracelular (Biro,  
*et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 90, págs. 654-658 (1993)). En el modelo de “lesión tisular” *in vitro*, se inhibieron  
la proliferación y migración de células A10 que se transdujeron con el vector de ciclina G1 antisentido en el área  
de lesión celular (Figura 18E). Tomadas en conjunto con las observaciones de citotoxicidad marcada, bloqueo del  
ciclo celular, y formación de sincitios multicelulares, estas observaciones proporcionan un respaldo adicional para  
30 el concepto de que la ciclina G1 puede representar una localización estratégica para intervención terapéutica en el  
manejo de trastornos proliferativos.

Una vez que se ha identificado un gen terapéutico potencial, el reto sigue siendo suministrar el vector de trans-  
ferencia de genes de forma eficaz al sitio fisiológico apropiado. En el caso de angioplastia de balón, la exposición  
35 del tejido endotelial y la activación mitogénica de las SMC adyacentes proporcionan condiciones favorables para el  
suministro de vectores retrovirales, ya que los genes terapéuticos suministrados por vectores retrovirales se expresan  
de forma preferente en células activas mitóticamente. En el presente estudio, se generaron sobrenadantes de títulos  
muy altos ( $10^8$  ufc/ml) para potenciar la eficacia de transducción de SMC vasculares, y por lo tanto, la eficacia de  
vectores retrovirales en este modelo experimental de reestenosis. De hecho, los estudios *in vitro* de suministro génico  
40 mediado por vector retroviral en SMC A10 embrionarias, puede ser particularmente pertinente para la fisiología de  
reestenosis, ya que numerosos informes han indicado que las SMC embrionarias y de neoíntima muestran respuestas  
similares a señales mitogénicas (Schwartz, *et al.*, *The Vascular Smooth Muscle Cell*, Schwartz, *et al.*, eds. págs. 81-  
139, Academy Press, Inc., New York (1995)). Este estudio en el modelo de lesión de arteria carótida de rata de re-  
estenosis demuestra la eficacia de este enfoque: las secciones de arterias carótidas lesionadas con balón que trataron  
45 con una infusión de un sobrenadante de vector retroviral de ciclina G1 antisentido altamente concentrado ( $10^8$  ufc/ml)  
mostraron una disminución significativa de la formación de neoíntima. Tomados en conjunto, estos datos respaldan  
la utilidad de los vectores retrovirales que llevan ciclina G1, solos o en combinación con p53 o el enfoque ahora clá-  
sico de timidinquinasa del Virus Herpes Simplex/GCV, en el desarrollo de nuevas estrategias de terapia génica para  
combatir la reestenosis vascular.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un uso de un agente que inhibe la proteína ciclina G1, en el que dicho agente comprende:

- 5
- i) oligonucleótidos antisentido o polinucleótidos o fragmentos de los mismos o secuencias que son complementarias a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 y que se unen a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 para evitar la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, o
  - 10 ii) anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que reconocen todos la proteína ciclina G1, donde los fragmentos o derivados de dicho anticuerpo tienen delecciones y/o sustituciones de residuos aminoacídicos respecto al anticuerpo no modificado

15 para preparar una composición farmacéutica para tratar un tumor en un hospedador.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha composición farmacéutica comprende el polinucleótido antisentido en una forma adecuada para transducir células tumorales de dicho hospedador con el mismo.

20 3. El uso de la reivindicación 2, en el que dicho polinucleótido antisentido está contenido en un vector retroviral como un vehículo de expresión.

4. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha composición farmacéutica comprende el anticuerpo o fragmento o derivado del mismo en una forma adecuada para transducir células tumorales de dicho hospedador con el mismo.

25 5. El uso de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo o fragmento o derivado del mismo se codifica por un polinucleótido que está contenido en un vector retroviral como un vehículo de expresión adecuado para transducir células tumorales.

30 6. Un método *in-vitro* para inmortalizar células no tumorales que comprende: transducir dichas células no tumorales con un polinucleótido que codifica una proteína ciclina G1 o un derivado o análogo de la misma, donde dicho derivado o análogo significa una proteína que tiene delecciones y/o sustituciones de residuos aminoacídicos respecto a la proteína ciclina G1 nativa pero que mantiene las mismas propiedades biológicas que la proteína ciclina G1 nativa o no modificada y que se reconoce por un anticuerpo que reconoce la proteína ciclina G1 nativa o no modificada.

35 7. El método de la reivindicación 6, en el que dicho polinucleótido que codifica la ciclina G1 o un derivado o análogo de la misma está contenido en un vector retroviral.

40 8. Un método *in-vitro* para potenciar la transducción de células con un vector retroviral que incluye un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, que comprende: transducir dichas células con un primer vehículo de expresión que incluye un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, donde dicho primer vehículo de expresión no es un vector retroviral; y transducir dichas células con un segundo vehículo de expresión que incluye un polinucleótido que codifica un agente terapéutico, siendo dicho segundo vehículo de expresión un vector retroviral.

45 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho vehículo de expresión es un vector adenoviral.

10. Un vehículo de expresión que incluye un polinucleótido que codifica un agente que inhibe la proteína ciclina G1, en el que dicho agente comprende:

- 50
- i) oligonucleótidos antisentido o polinucleótidos o fragmentos de los mismos o secuencias que son complementarias a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 y que se une a un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 para evitar la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, o
  - 55 ii) anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que reconocen todos la proteína ciclina G1, donde los fragmentos o derivados de dicho anticuerpo tienen delecciones y/o sustituciones de residuos aminoacídicos respecto al anticuerpo no modificado.

11. El vehículo de expresión de la reivindicación 10, en el que dicho vehículo de expresión es un vector viral.

60 12. El vehículo de expresión de la reivindicación 11, en el que dicho vector es un vector retroviral.

13. El vehículo de expresión de la reivindicación 11, en el que dicho vector es un vector adenoviral.

65 14. El uso de un agente que inhibe la proteína ciclina G1, en el que dicho agente comprende:

- i) oligonucleótidos antisentido o polinucleótidos o fragmentos de los mismos o secuencias que son complementarias a al menos una parte de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 y que se une a un

## ES 2 288 756 T3

polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1 para evitar la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína ciclina G1, o

- 5           ii) anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos que reconocen todos la proteína ciclina G1, donde los fragmentos o derivados de dicho anticuerpo tienen deleciones y/o sustituciones de residuos aminoacídicos respecto al anticuerpo no modificado

para preparar una composición farmacéutica para evitar o tratar la reestenosis en un hospedador.

- 10           15. El uso de la reivindicación 14, en el que dicha composición farmacéutica comprende el polinucleótido antisentido en una forma adecuada para transducir células de dicho hospedador con el mismo.

- 15           16. El uso de la reivindicación 15, en el que dicho polinucleótido antisentido está contenido en un vector retroviral como un vehículo de expresión.

17. El uso de la reivindicación 14, en el que dicho agente que inhibe la proteína ciclina G1 es activo en el sitio de un procedimiento vascular invasivo.

- 20           18. El uso de la reivindicación 17, en el que dicho procedimiento vascular es una angioplastia.

19. El uso de la reivindicación 17, en el que dicho procedimiento vascular es un injerto vascular.

- 25           20. El uso de la reivindicación 14, en el que dicho agente que inhibe la proteína ciclina G1 es activo en el sitio de una lesión vascular.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1A

```

1  acaactgactctcagaactgctacaccagctgaatgccctgttggaacaggagtctaga  60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
61  tgcagccaaggctctgtggtttgagactaatgagcctgcacacgataatggcctcaga  120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
121  atgactgcaagactaaggactttgaagtaaaagatcttctcgtctaactcagttcccc  180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      M T A R L R D F E V K D L L S L T Q F F  20
181  ggctttgacacagagacatttctctagctgtgaatttactggacagattcctgtctaaa  240
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      G F D T E T F S L A V N L L D R F L S K  40
241  atgaaggtagcagcccagcaccttgggtgtgtggactgagctgtttatttggctgta  300
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      M K V Q P K M L C C V C L S C F Y L A V  60
301  aaatcaatagaaggaaaggaatgtcccattggcaactgacttgatccgastaagtcaa  360
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      K S I E E R N V P L A T D L I R I S Q  80
   tataggtttacggtttcagacttgatgagaatggaagaattgtattggagaagggtgtgt

```

COMBINAR CON FIG. 1B

FIG. 1B

COMBINAR CON FIG. 1A

361 Y R F T V S D L M R N E K I V L E K V C 420  
 tggaagtcaaagctactgcctttcaatttctgcaactgtattattcactccttcaa 480  
 V K V K A T T A F Q F L Q L Y S L L Q 120  
 481 gagaacttgccacttgaaggagaatagcattaattttgaaagactagaagctcaactg 481  
 E N L P L E R R N S I N F E R L E A Q L 140  
 541 aaggcatgtcattgcaggatcattttctaaagtaagccttctgtgttgccaccgtct 600  
 K A C N C R I I F S K A K P S V L A L S 160  
 601 atcattgcattagagatccaagcacagaaagtgtgtagagtaacagaaaggaatagaatgc 660  
 I I A L E I Q A Q K C V E L T E C I E C 180  
 661 cttcagaacattccaagataaaatggcagagatctgaccttctggcaagagcttgcattcc 720  
 L T F W Q E L V S 200  
 721 aaatggttaactgaatattcaccaaa aagcgttccaacaaatgttcagaagttgaaa 780  
 K C L T E Y S S N K C S K P N V Q K L K 220  
 COMBINAR CON FIG. 1C

COMBINAR CON FIG. 1B FIG. 1C

781	tggattgtttctggcgctactgcacggcaattgaagcatagctactacagaataactcac	840
	W I V S C R T A R Q L K M S Y Y R I T M	240
841	ctccaacaattcctgaaatggcccttaactggattattacagcaccacaaaacttctc	900
	L P T I P E M V P *	249
901	tgaagccttctccacaaccttgctctatggattccataatgttacaatggatttaagct	960
961	atgaagcctcaaaaacatcacgagataagcacgatggctcagacttgggaaaaactgccta	1020
1021	atattatgctgtagcyyaattatgtttagatttgaattcattctctgtgaagcattcaaagca	1080
1081	aagctaaaagcctaaatgtgaaatgctaatgacaagcctgagaaggtaaaactgtgaatct	1140
1141	tcatttctatcattgatctaactttagatattggatcaacataatttagtggtattgaaa	1200
1201	atgctattggaggagtcacacctaactataactatcaactatcagctctcccacagcttcaatca	1260

COMBINAR CON FIG. 1D

FIG. 1D

COMBINAR CON FIG. 1C

```

1261 ctgccattattcctaactcctactcctacttaaatTTAAGTTATGAGGTTTATGTCAAAAG 1320
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1321 caacattcacaaatgtactTTAAGGcATAAAGGGTTAACATTCTAGGCAGTATAAA 1380
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1381 cacaccataatgcaagtaataggtAATCTAGAGATGTGGACTTATTGCTATATAGGA 1440
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1441 attacatttaaattgaggcatttataagaAATACAGACCTATAAGTTGGCATATTC 1500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1501 attaagttatcctttaataatttctagaAACAGGTGACATTTGATCTATCGATAAAATTT 1560
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1561 tatacagaacctactgcctcaaaactgaatcccATCAAGAAAAGTCTTCTATTGTACCA 1620
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1621 gtaactcaaaaataaattatcacttcgaaaactgcttcccACACTAAGGTAAGTTCAGA 1680
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1681 ctagattgaacactccagaatttttactacagactgTGTTAAGTTAGAAGTGAAGGCA 1740
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
atttataaatagagaatatacttccactgctgccttactgtGCCAAAACAaaaatctt

```

COMBINAR CON FIG. 1E





FIG. 2

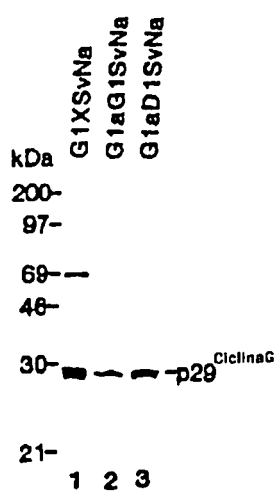
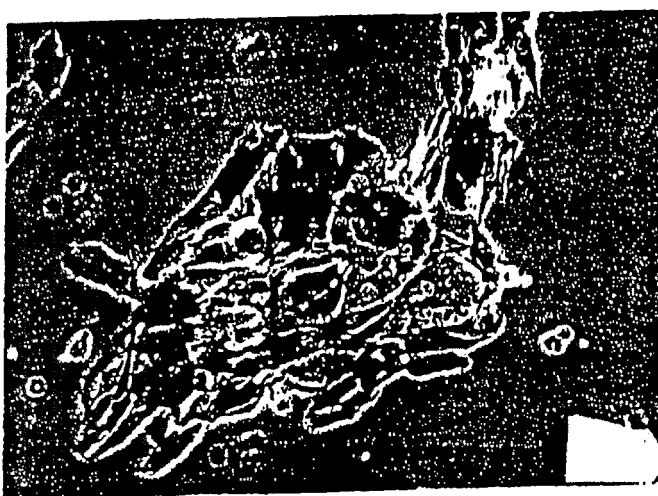
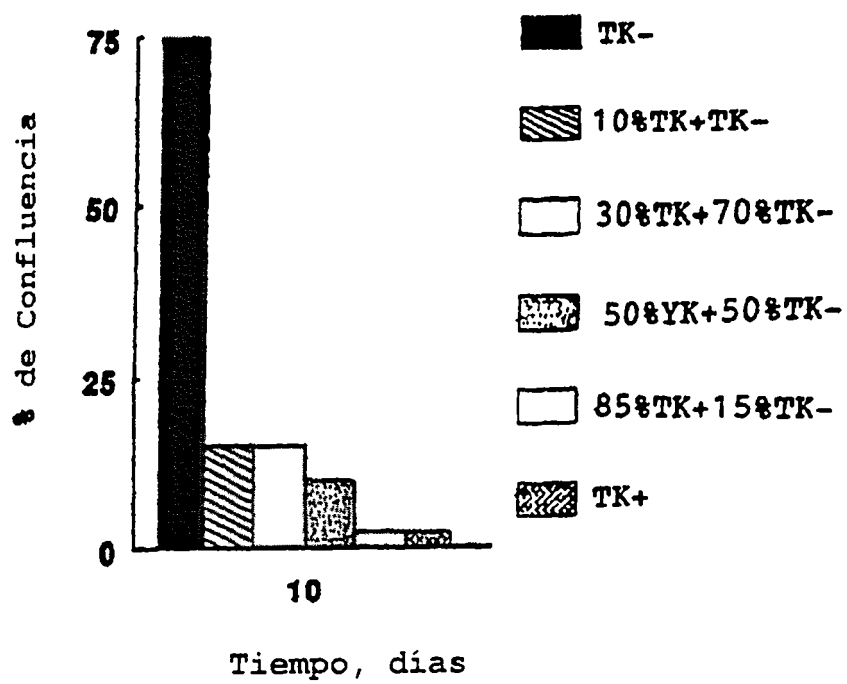


FIG. 6

FIG. 3



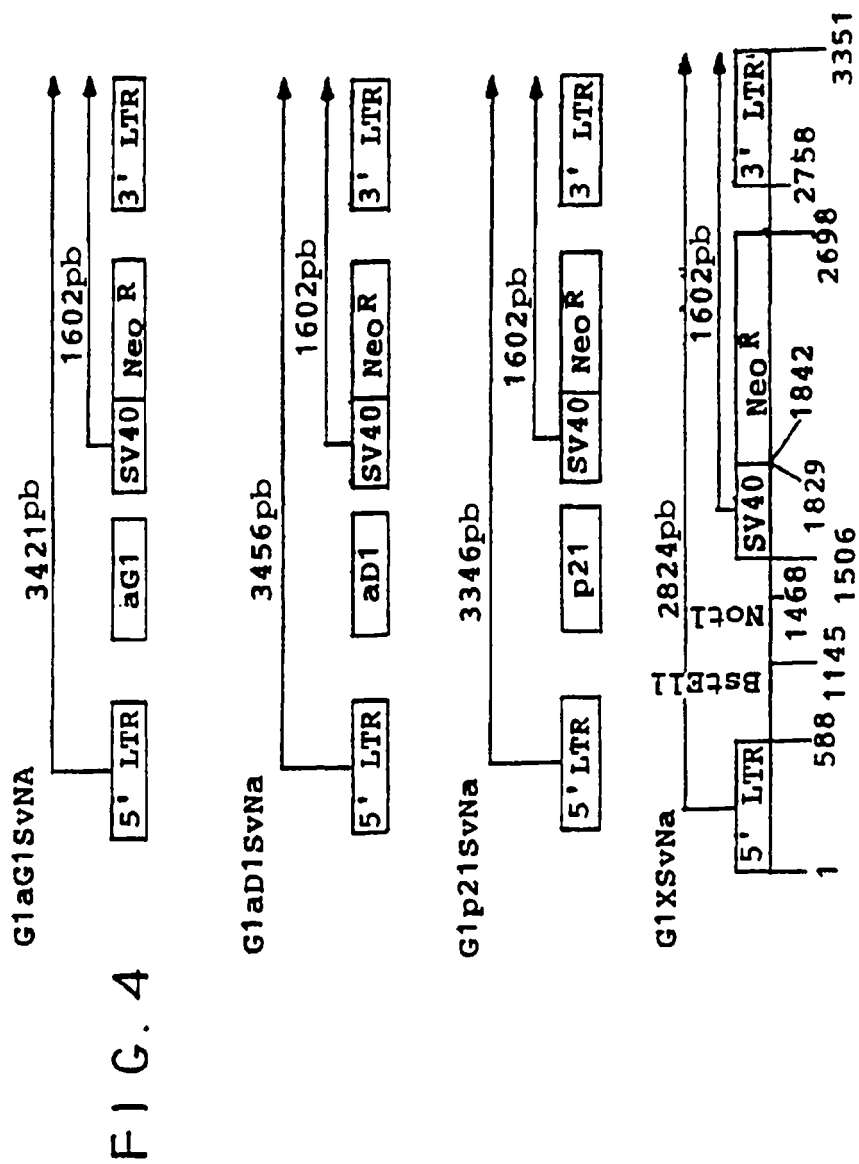


FIG. 5

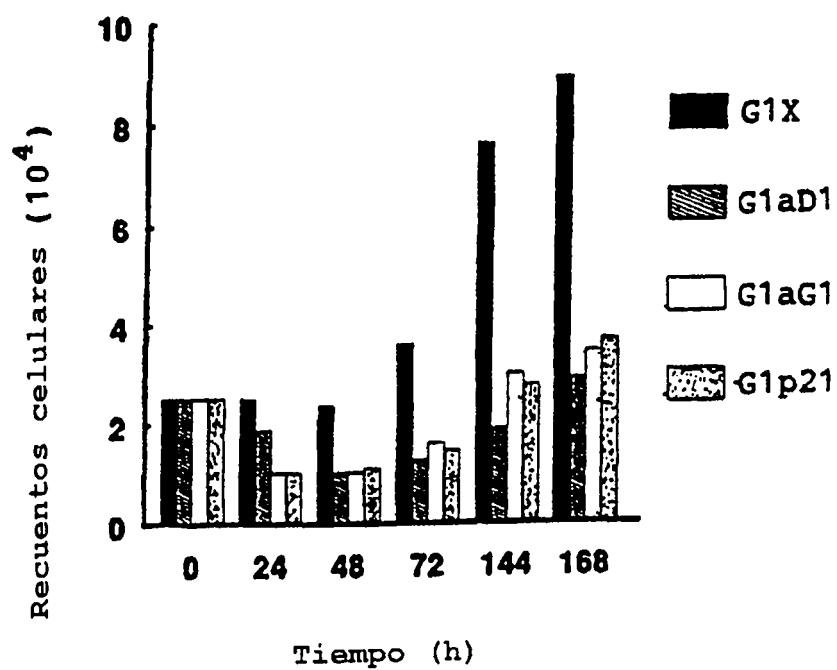


FIG. 7



FIG. 8

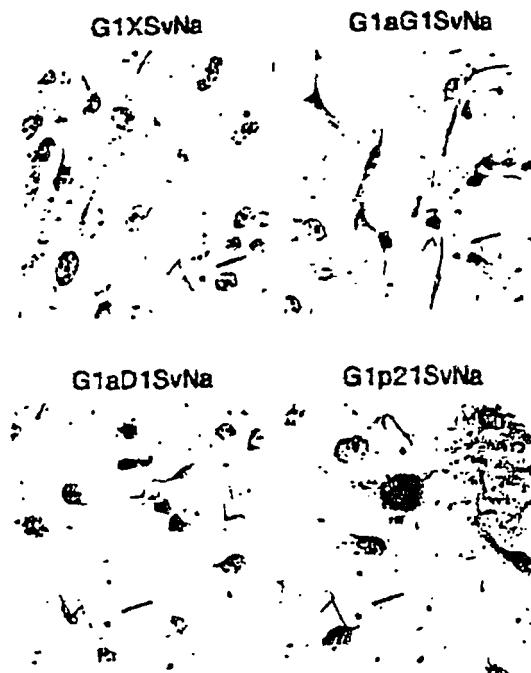


FIG. 9A

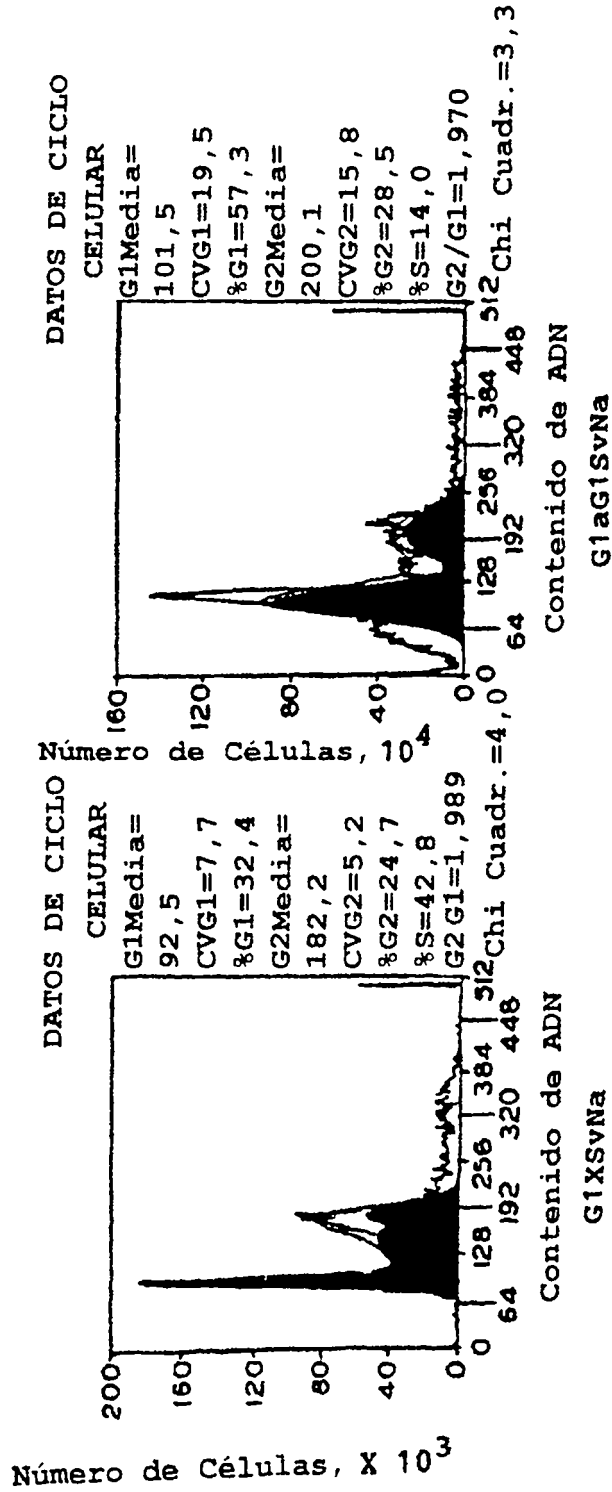


FIG. 9B

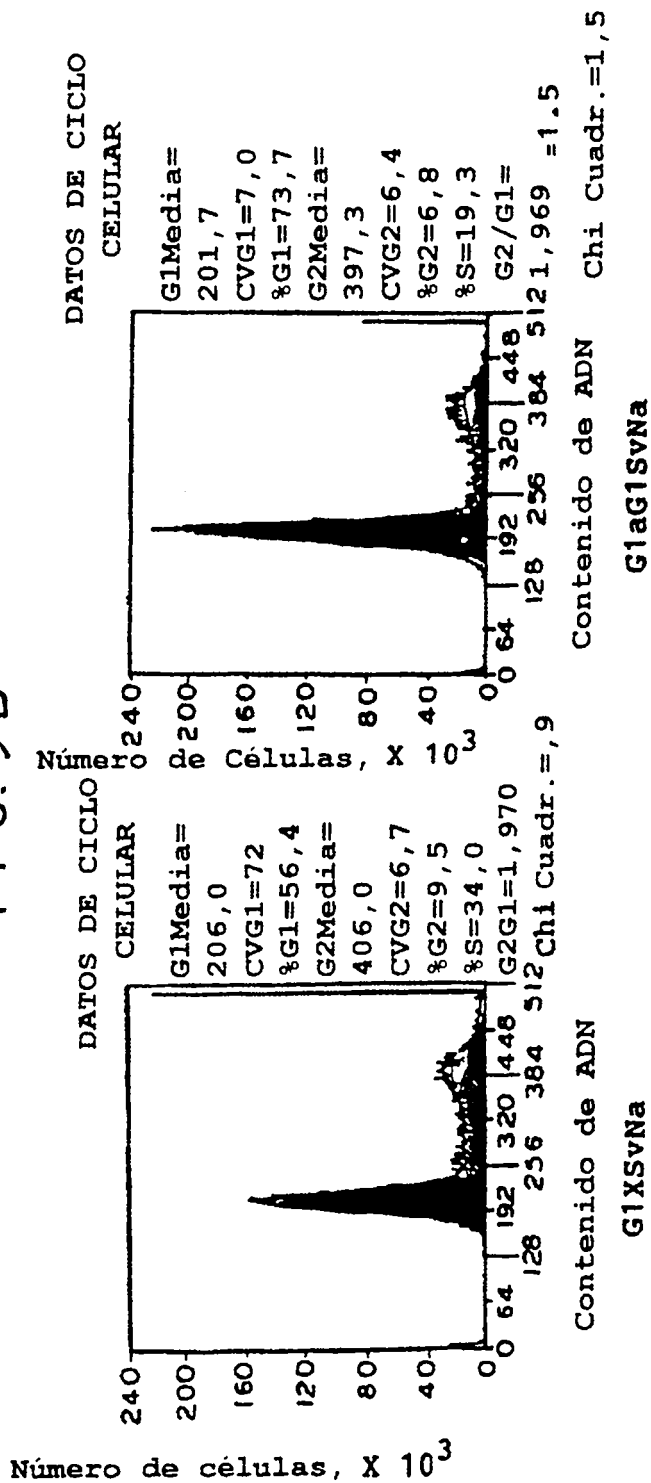


FIG. 10

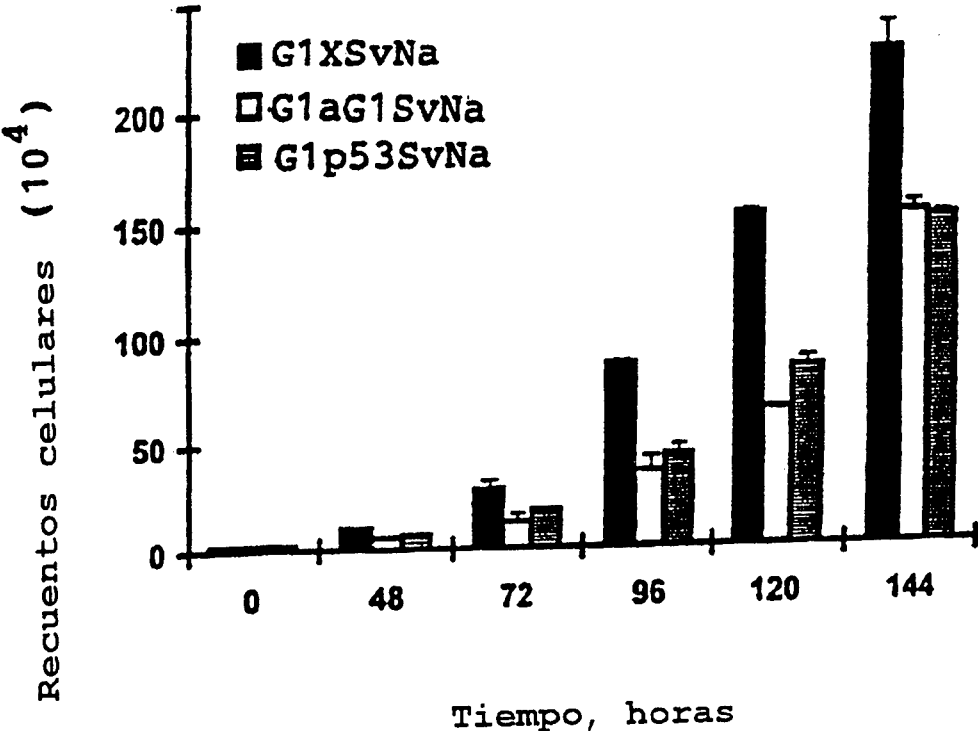




FIG. II

G1XSvNa



G1aG1SvNa



G1p53SvNa



FIG. 12

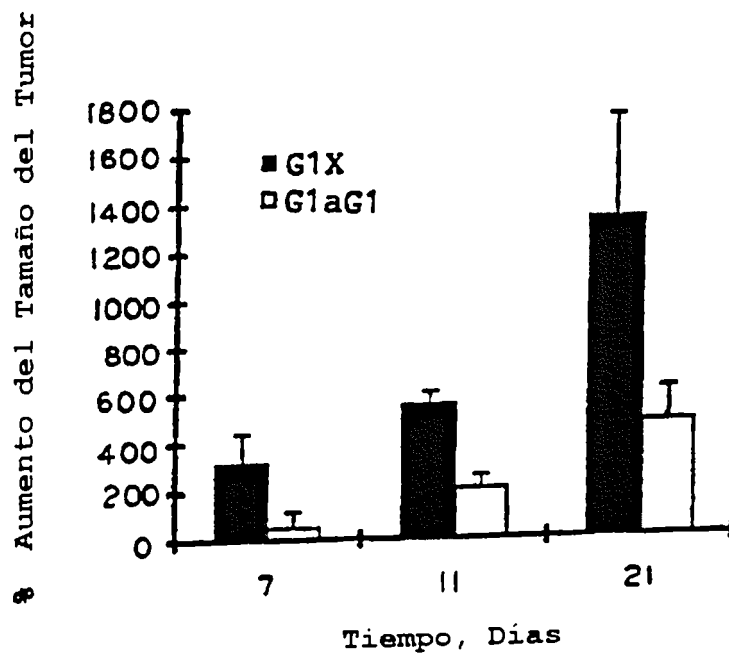


FIG. 13A

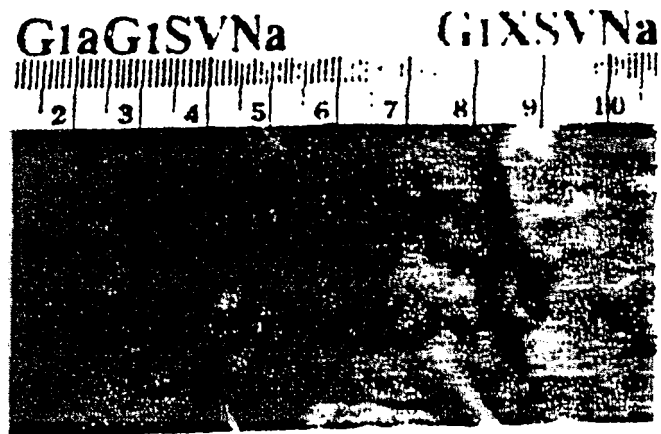


FIG. 13B

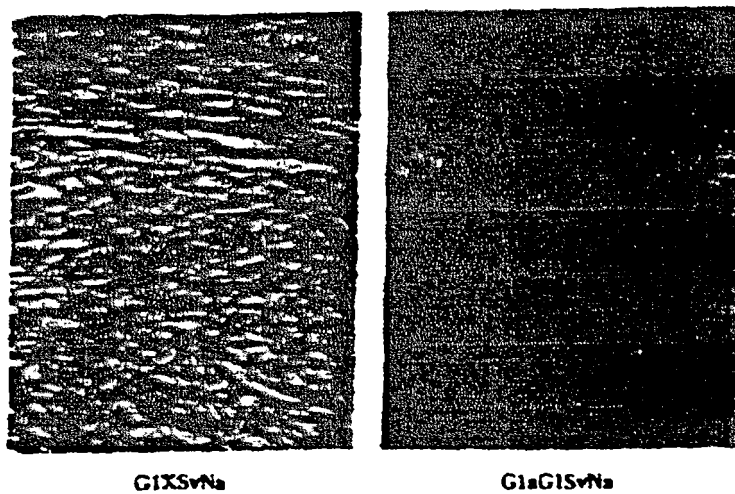


FIG. 14

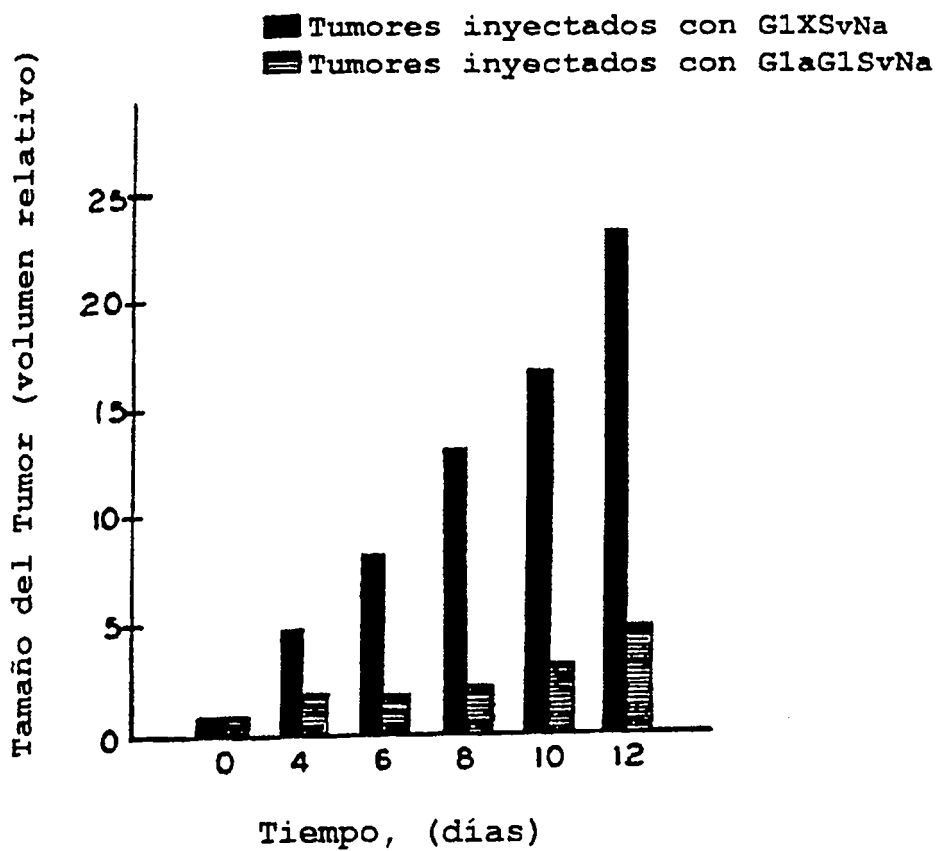


FIG. 15A

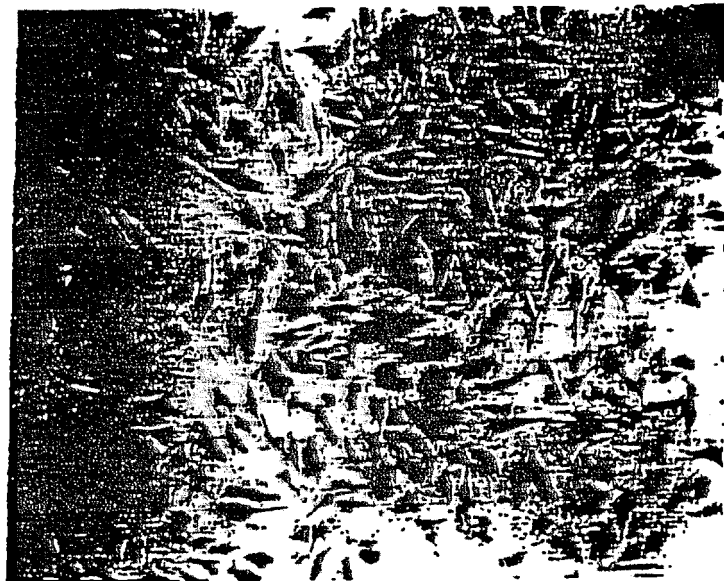
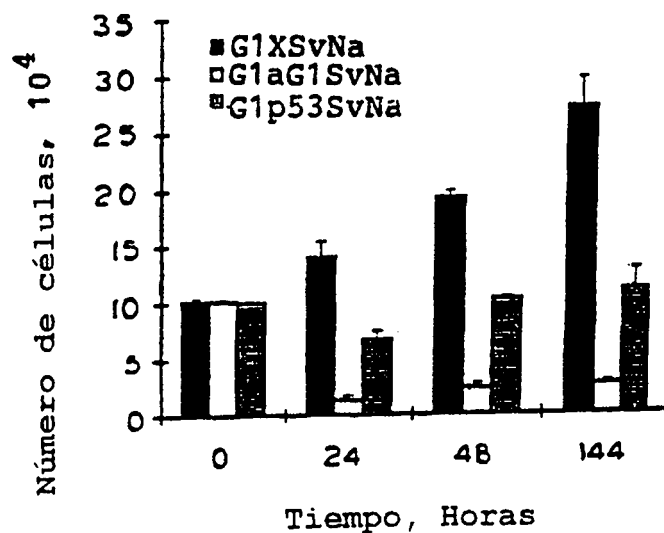


FIG. 15B



Incorporación de Timidina  $H^3$ ,  $10^3$  dpm

FIG. 15C

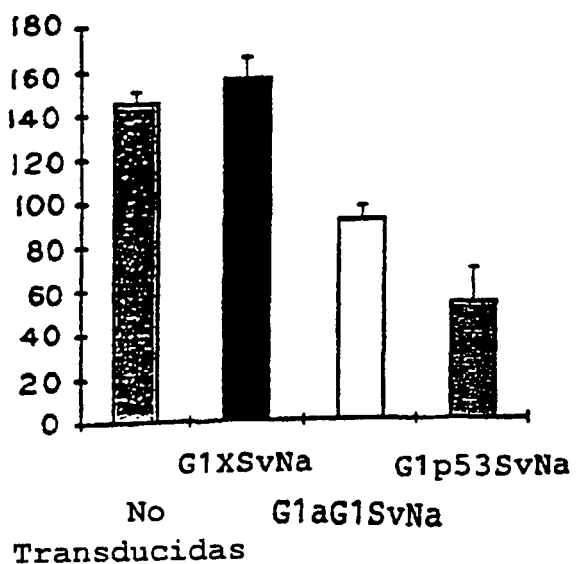


FIG. 16A

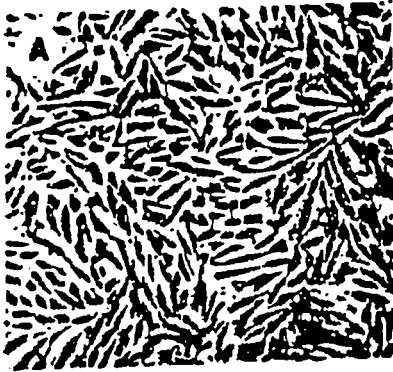


FIG. 16B



FIG. 16C



FIG. 16D



FIG. 16E

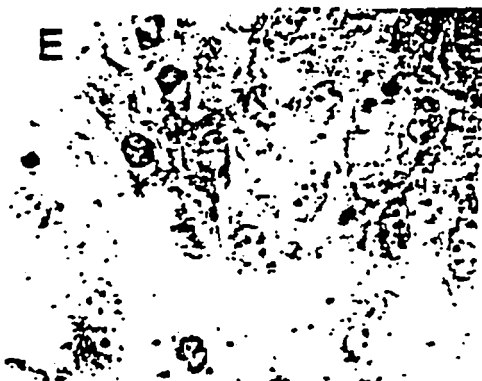


FIG. 16F



FIG. 17

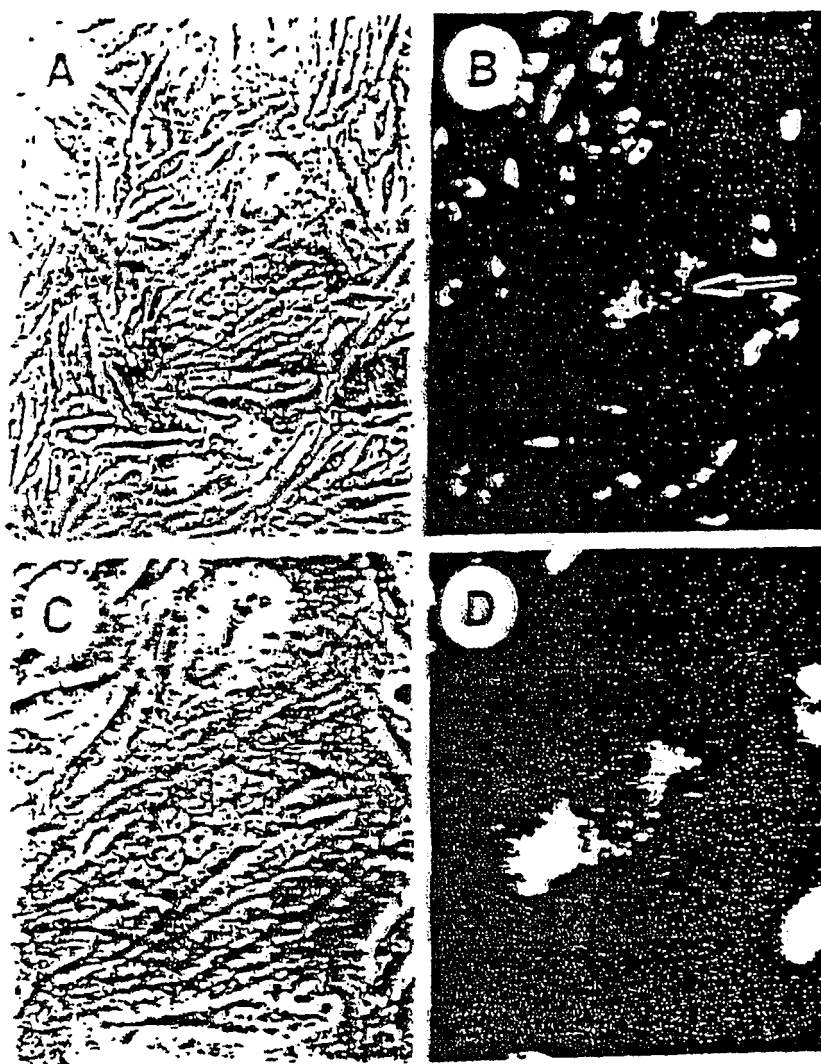




FIG. 17E

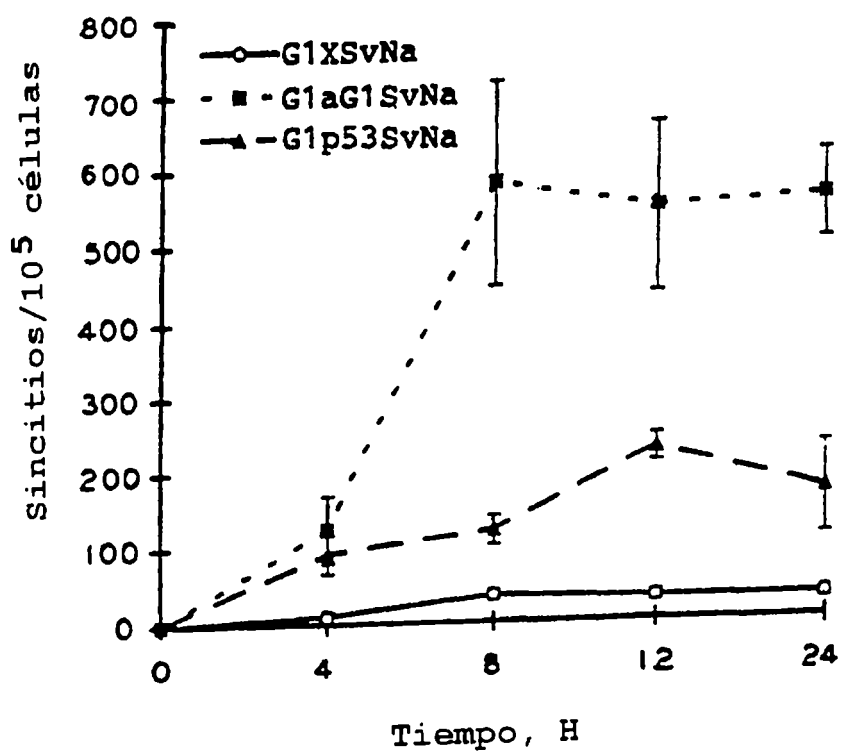


FIG. 18A

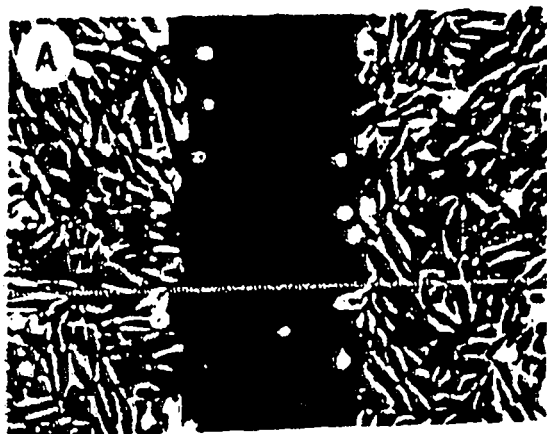


FIG. 18B



FIG. 18C



FIG. 18D



FIG. 18E



FIG.19A



FIG.19B



FIG.19C

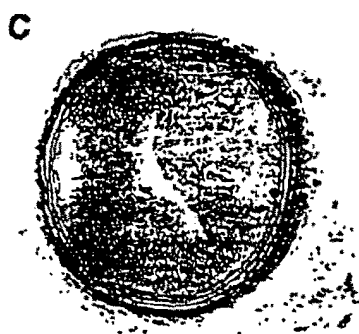


FIG.19D

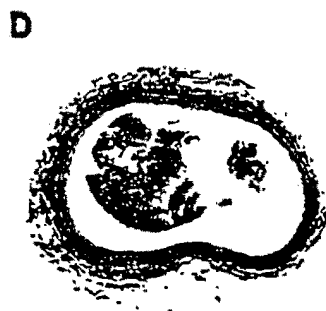


FIG.19E

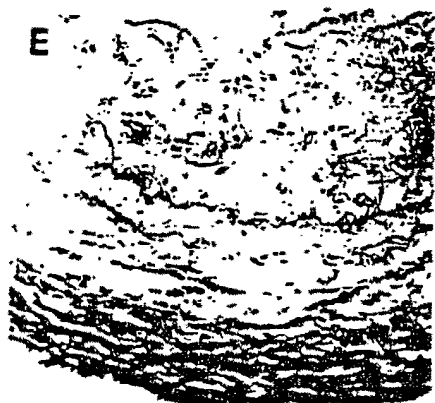


FIG.19F

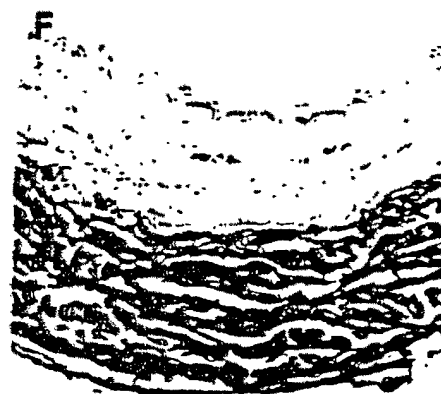
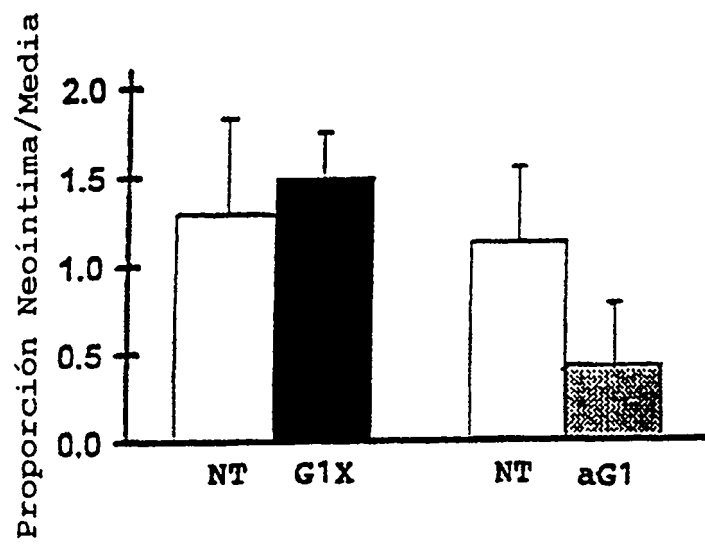


FIG.19G



# ES 2 288 756 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novarits AG

5 <120> Expresión de ciclina G1 en tumores

<130> ciclinaG1

10 <140>

<141>

15 <150> 96937833

<151> 1996-10-31

<160> 1

20 <170> PatentIn ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 2219

<212> ADN

<213> humano

30 <400> 1

```
acaactgact ctcagaaact gctacaccag ctgaatgccc tghttgaaca ggagtctaga 60
tgtcagccaa aggtctgtgg tttgagacta attgagtctg cacacgataa tggcctcaga 120
35 atgactgcaa gactaagggg ctttgaagta aaagatcttc ttagtctaac tcagttcttt 180
ggctttgaca cagagacatt ttctctagct gtgaatttac tggacagatt cctgtctaaa 240
atgaaggtac agcccaagca ccttgggtgt gttggactga gctgctttta tttggctgta 300
aaatcaatag aagaggaaa gaaatgtcca ttggcaactg acttgatccg aataagtcaa 360
40 tataggttta cgttttcaga cttgatgaga atggaaaaga ttgtattgga gaaggtgtgt 420
tggaaagtca aagctactac tgcctttcaa tttctgcaac tgtattatc actcctcaa 480
gagaacttgc cacttgaaag gagaatagc attaatattg aaagactaga agctcaactg 540
aaggcatgtc attgcaggat catattttct aaagcaaagc cttctgtgtt ggcattgtct 600
atcattgcat tagagatcca agcacagaag tgtgtagagt taacagaagg aatagaatgt 660
45 cttcagaaac attccaagat aaatggcaga gatctgacct tctggcaaga gcttgtatcc 720
aaatgtttaa ctgaatatc atcaataag tgttccaanc caaatgttca gaagttgaaa 780
tggattgttt ctggcgctac tgcacggcaa ttgaagcata gctactacag aataactcac 840
cttccaacaa ttctgaaat ggtcccttaa ctggattatt acagaccaa aaaacttctc 900
50 tgaagccttt ctccacaacc ttgttctatg gattccataa tgttacaatg gatttaagct 960
atgaagcctc aaaacatcac gagataagca tgatggtctc agacttggga aaactgccta 1020
atattatgct gtagtggaat tatgtttaga tttgaattca tctgtgaagc attcaaagca 1080
aagctaaaag cctaaatgtg aaatgcta gacaagcctg agaaggtaaa ctgtgaatct 1140
55 tcattttctat cattgatcta actttagata ttggatcaat atatttaggt ggtattgaaa 1200
atgctattgg aggagtcaca ctaatactat caactatcag tcttcccaca gcttcaatca 1260
ctgtcattat tctaactccta ctctactta aattttaagt tatgaggttt atgtcaaaaag 1320
caacatttca caaatgtact ttttaaggcat aataagggtt aacattctag gcagtataaa 1380
60 cacaccccat aatgcaagta ataggaatc tagagatgtg gactttattg ctatatggga 1440
```

65

# ES 2 288 756 T3

attacattta aatttgaggg cttttatata agaaatacag acctataagt tggcatattc 1500  
attaagttat cttaaatatt tttctagaaa caggtgacat ttgatctatc gataaaatct 1560  
tatacagaac ctactgcctc aaactgaatc ccatcaagaa aactagtctc tattgtatta 1620  
5 gtaactcaaa ataaattatc acttcgaaaa cttgctttcc cacactaagg taagttcaga 1680  
ctagattgaa cactccagaa ttttttacta cagactgttt ttaagttaga agtgatggca 1740  
atthtataaa tagagaatat acttcactg atgcccttac tgtgccaaaa caaaatctt 1800  
aagaaaagca agtagacacc ttcataacta tgaatgaagc tgctgaagta gtgttttagga 1860  
10 tcctccatgg cagttagtga atgtaagaag tacagtgtta aagtgttga aacagttact 1920  
cagtgcaatg tatagcctga gtctatccat gatggtata tccaattga catcacgta 1980  
tggatcagta cacaatgaaa aaccaaagaa ccacgtatat cttattctta acttttgtaa 2040  
accatgtttt atgggtaact ttttagtttt cccaaaagge tgataaattt caatattttg 2100  
aatacatcat tgtaatttt gagttggcag aggtaaacta accaactacc attatgtttt 2160  
15 agtactaagg gatatacctt tcaataaagt taatgaaatt caaaaaaaaa aaaaaaaaa 2219

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65