



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 553**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/867** (2006.01)  
**C12N 15/90** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 7/01** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05799803 .1**  
96 Fecha de presentación : **01.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1841878**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2007**

54 Título: **Procedimiento para la generación de líneas celulares que producen virus y líneas celulares.**

30 Prioridad: **02.11.2004 EP 04025919**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.04.2011**

73 Titular/es:  
**Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH  
Inhoffenstrasse 7  
38124 Braunschweig, DE**

72 Inventor/es: **Wirth, Dagmar;  
Hauser, Hansjörg y  
Schucht, Roland**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 356 553 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

La presente invención se refiere a un procedimiento para generar líneas celulares que producen virus y líneas celulares productoras madre. En particular, la presente invención se refiere a métodos que permiten la producción de líneas celulares que producen virus y líneas celulares productoras madre sin llevar a cabo un trabajo de selección laborioso. Además, la presente invención se refiere a líneas celulares que producen virus obtenidas con los métodos según la presente invención así como a virus obtenidos usando dichas líneas celulares.

**Antecedentes de la invención**

Recientes éxitos en ensayos clínicos de terapia génica han demostrado el alto potencial del uso de la terapia génica para curar y ralentizar una gran variedad de enfermedades. Sin embargo, la introducción eficaz de genes terapéuticos en células o tejidos humanos sigue siendo el principal problema que ha de solucionarse.

Se han sugerido diversos métodos para introducir los nucleótidos o genes terapéuticos en las células o el tejido incluyendo el uso de vectores virales. Generalmente, en las células se expresan genes auxiliares virales (las denominadas funciones auxiliares) para empaquetar específicamente el gen terapéutico de interés en partículas virales y para transducir el mismo en las células o tejidos diana. Se usan frecuentemente vectores adenovirales dado que las partículas son robustas, pueden producirse fácilmente en altos títulos e infectar eficazmente un amplio espectro de células. Los retrovirus, en particular los géneros de retrovirus y lentivirus de tipo C de mamíferos representan el tipo de virus ampliamente usado para la transferencia génica estable y la expresión del producto génico. Se han desarrollado sistemas de vectores altamente sofisticados para fines especializados. El conocimiento de la técnica anterior se basa principalmente en virus de tipo C de mamíferos. Por consiguiente, la mayoría de los ensayos de terapia génica se basan en este sistema de transferencia de virus. Estos métodos de administración génica retroviral recombinante se han usado exhaustivamente en vista de las siguientes ventajas: i.) la entrada eficaz del material genético en las células; ii.) un proceso eficaz, activo de entrada en el núcleo de la célula diana; iii.) niveles relativamente altos de expresión génica; iv.) el potencial para seleccionar como diana subtipos celulares mediante el control de la unión vector-célula diana y el control específico de tejido de la expresión; v.) una falta general de inmunidad preexistente del huésped; y vi.) conocimiento sustancial y experiencia clínica que se ha obtenido con tales vectores.

En la actualidad, se usan satisfactoriamente retrovirus para la transducción *ex vivo* en experimentos de terapia génica. Sin embargo, la tecnología de producción para vectores retrovirales está en un estado temprano. Las terapias se ven dificultadas por i) la inestabilidad inherente de las partículas virales infecciosas, ii) la dificultad para producir grandes cantidades de virus, y iii) la amplia gama de huéspedes de las envueltas virales disponibles actualmente y la sensibilidad al ataque por el complemento humano. Por tanto, tanto para aplicaciones *ex vivo* como *in vivo*, sus desarrollos significativos impiden una aplicación extendida de la terapia génica retroviral. En la actualidad, uno de los principales obstáculos es la producción de un gran número de virus estables. Dicho proceso de producción comprende la generación de virus, por ejemplo vectores retrovirales, con líneas celulares que producen virus.

Los retrovirus recombinantes para su uso en terapia génica transducen un vector retroviral que codifica para el gen efector (terapéutico) o secuencia de nucleótidos terapéutica en las células o tejidos diana. En la actualidad, se producen tras la transfección del vector en las denominadas líneas celulares de empaquetamiento que expresan de manera estable las proteínas virales gag/pol y env. Este principio se aplica para los vectores clásicos basados en virus de la leucemia murina de Moloney (VLM). Los lentivirus se producen principalmente a partir de sistemas de expresión transitoria dado que la toxicidad de los genes auxiliares, en particular, de la proteína VSV-G (véase a continuación) requiere una expresión restringida en el tiempo.

La construcción de células de empaquetamiento para vectores retrovirales es un procedimiento tedioso. Se necesitan la transfección secuencial de constructos de expresión de gag/pol y env apropiados y procedimientos de selección que requieren mucho tiempo para lograr una expresión equilibrada y de alto nivel de todos los componentes. La heterogeneidad en la expresión mediante clones celulares individuales se debe a i.) la integración al azar de los genes auxiliares en el ADN cromosómico de la célula huésped y ii.) números de copias variables de los constructos transfectados. En la actualidad, se aplica la subclonación y el examen de subclones individuales para aislar células de empaquetamiento adecuadas.

Las proteínas de la envuelta exterior (env) son ligandos para receptores celulares que median la entrada viral y definen la gama de huéspedes del virus. Los retrovirus permiten la sustitución de sus env y se derivan partículas retrovirales mixtas mediante esta técnica denominada pseudotipado. Para este fin, se usan proteínas env que se han aislado de virus no murinos que se producen de manera natural (por ejemplo GALV, virus de la leucemia del simio gibón y VEV G (virus de la estomatitis vesicular, proteína G). Además, se ha creado un gran número de nuevas proteínas env mediante técnicas recombinantes principalmente con el objetivo de especificar la gama de huéspedes, logrando de ese modo el direccionamiento del virus a tipos de células específicas, y confiriendo resistencia al complemento humano. Desarrollos adicionales en las proteínas env prometen terapias mejoradas. Esto también es importante en vista de la inestabilidad de los retrovirus inherente conocida que se debe en gran medida a las proteínas env. La inestabilidad de los retrovirus durante el proceso de producción, almacenamiento o durante los procedimientos de purificación es una limitación importante para la mayoría de las aplicaciones. En la actualidad, la única manera de mejorar significativamente la estabilidad retroviral es reemplazando la proteína env

por la proteína VEV G, dando como resultado partículas que pueden concentrarse y almacenarse durante un periodo de tiempo prolongado. A pesar de su ventaja en el uso de VEV G para pseudotipar retrovirus, la expresión de VEV G es tóxica para las células productoras. Hasta la fecha se producen partículas de virus seudotipados con VEV G en sistemas de transfección transitoria o mediante la expresión inducible de la proteína VEV G, lo que limita, por tanto, la aplicabilidad del sistema.

El uso de las proteínas env novedosas para fines terapéuticos se ve actualmente dificultado por el hecho de que para cada una de las diferentes proteínas env, ha de construirse una línea celular de empaquetamiento individual. Cada una de estas líneas celulares ha de establecerse de nuevo según los procedimientos descritos anteriormente dado que aún no se han desarrollado métodos más económicos.

Los problemas descritos anteriormente se aplican, cambiando lo que se deba cambiar, a otro sistema viral, como el sistema de lentivirus, el sistema de adenovirus y el de virus asociados a adenovirus.

Por tanto, para la producción eficaz de retrovirus, deben expresarse los genes auxiliares virales (gag/pol y env) así como el vector terapéutico en una denominada razón "equilibrada" en líneas celulares productoras. Según el estado de la técnica, se establecen líneas celulares de empaquetamiento como precursores mediante integración al azar de los genes auxiliares virales en el genoma de la célula huésped. Dado que el sitio de integración influye de manera drástica en la expresión del gen recombinante y su estabilidad, se requiere una selección intensiva para aislar clones celulares de empaquetamiento óptimos. Este procedimiento ha de seguirse independientemente para cualquier gen env. Incluso una vez que se establezca esta línea celular de empaquetamiento, ha de realizarse una segunda ronda de selección para la preparación de las partículas de virus terapéuticos. Para el establecimiento de las células de empaquetamiento que producen retrovirus terapéuticos, es decir, líneas celulares que producen virus, las células de empaquetamiento han de transfectarse con un vector terapéutico. La naturaleza del sitio de integración elegido de manera aleatoria así como el número de copias afecta el título de virus resultante, necesiéndose de nuevo otra ronda de selección que requiere mucho tiempo para lograr una expresión del vector eficaz y estable. Obviamente, esta selección ha de repetirse para cualquier virus terapéutico de interés.

En particular, el procedimiento de selección laborioso y que requiere mucho tiempo comprende las siguientes etapas:

- (i) transfección del vector y selección de clones celulares individuales transfectados;
- ii.) evaluación de la expresión transgénica;
- iii.) evaluación del título de virus recombinante;
- iiii.) evaluación de la estabilidad de la expresión y el título a lo largo de periodos de cultivo más largos;
- iiv.) caracterización del sitio de integración cromosómica y determinación de los números de copias del vector;
- iv.) prueba para determinar la ausencia de RCR (retrovirus de replicación competente).

Además, se encontró que cada clon celular productor de virus necesita una adaptación adicional a las condiciones de producción óptimas. Este trabajo lleva adicionalmente una cantidad considerable de tiempo y trabajo con respecto al proceso de producción global.

Para facilitar esta selección, en la mayoría de los casos, los virus terapéuticos portan adicionalmente un gen marcador o de selección. Este gen marcador permite seleccionar la integración estable y/o la expresión a largo plazo, de alto nivel. Sin embargo, en los últimos años han surgido pruebas de que la transducción de genes adicionales puede suponer problemas significativos en entornos terapéuticos. Uno de los problemas principales es que se provoca una respuesta inmunitaria contra los genes foráneos (por ejemplo marcadores de selección). Esto puede dar como resultado una eliminación eficaz de las células transducidas, limitando o excluyendo de ese modo el éxito terapéutico. Incluso surgieron más preocupaciones desde que se observó leucemogénesis por inserción en el modelo de ratón debido a la transducción de un gen marcador que se consideraba anteriormente que era biológicamente inerte. Por tanto, el objetivo global para mejorar y para producir una terapia génica viral más segura es excluir cualquier secuencia codificante además del gen terapéutico de interés.

En vista de los problemas y obstáculos explicados de manera resumida anteriormente, en la actualidad no es posible una amplia aplicación de métodos de administración génica que usan virus, en particular retrovirus.

### **Sumario de la presente invención**

La presente invención proporciona nuevos métodos para la producción de líneas celulares que producen virus. En particular, la presente invención tiene por objetivo proporcionar un sistema mejorado para preparar virus que pueden ser de posterior uso en medicina.

En particular, la presente invención proporciona un método para la generación de líneas celulares que producen virus usando una línea celular madre una vez producida anteriormente. La presente invención también proporciona métodos para la producción de la línea celular productora madre. Un ejemplo de esta línea celular

madre se representa esquemáticamente en la figura 1. Dicha línea celular permite la integración fácil, específica y predecible de casetes de expresión que contienen los nucleótidos o el gen de interés (figura 1 (i)) y/o los restos de la envuelta (figura 1 (iii)) necesarios para producir el tipo de virus deseado. Debido al sitio de integración predicho, no se ven afectados el título, las condiciones de cultivo ni el registro de seguridad.

5 Cuando se usa la línea celular madre no es necesaria ninguna selección laboriosa adicional de las células tras dirigir el casete de expresión de interés a los locus cromosómicos ya etiquetados en la línea celular madre. Por tanto, se permite el simple intercambio de diversos casetes de expresión mientras que se mantienen las propiedades de la línea celular madre que se seleccionó una vez para un sitio de integración cromosómica de alta expresión que permite la producción de virus alta y predecible en condiciones de cultivo conocidas.

10 La presente invención se refiere además a la línea celular que produce virus que puede obtenerse con el método según la presente invención. La línea celular que produce virus según la presente invención permite la producción normalizada de virus que pueden usarse finalmente en terapia génica. Además, la presente invención se refiere a la línea celular productora madre que puede obtenerse con el método según la presente invención. Finalmente, la presente invención se refiere al uso de dichas células para la producción de virus.

## 15 Breve descripción de las figuras

Figura 1:

Línea celular productora madre con sitios de integración etiquetados para el intercambio del vector retroviral y el gen env.

20 Esta visión general muestra a modo de ejemplo el esquema de la generación de líneas celulares productoras de virus terapéuticos. En una primera etapa, un vector de etiquetado retroviral y las funciones auxiliares gagpol y env se integran de manera estable en el genoma del huésped. Tanto el vector retroviral como el gen env están flanqueados por sitios FRT, permitiendo de ese modo el reemplazo específico de sitio de los casetes de expresión por un vector terapéutico y/o un gen env alternativo.

Figura 2:

25 Generación de una línea celular productora madre con un casete intercambiable

30 A: Se estableció un vector de etiquetado retroviral que porta un gen indicador (GFP), un elemento IRES de EMCV y un gen de resistencia a higromicina fusionados al gen de la timidina cinasa (para una mejor visión general no se muestra el elemento de EMCV). En la región U3 en 3' de la LTR se integró un casete de etiquetado que comprende dos sitios FRT que no interaccionan (mostrados como triángulos) y un codón de iniciación deficiente, por tanto, un gen de neomicina fosfotransferasa (npt) no funcional (carril superior). Este vector se transdujo de manera estable en células de empaquetamiento PG13. Para el etiquetado, se infectaron células 293 con el sobrenadante del virus usando una multiplicidad de infección inferior a 0,01 para garantizar la integración de una única copia. En las células infectadas, el vector retroviral se integra de manera estable según el carril inferior. Como consecuencia de la transcripción inversa, la región U3 en 3' que incluye el casete de etiquetado se duplica en el extremo 5', dando como resultado el estado proviral representado.

35 B: Se analizaron las células etiquetadas, infectadas, según su expresión de GFP. La figura muestra un histograma de superposición de un análisis por citometría de flujo de un clon celular etiquetado (línea gruesa) en comparación con células no infectadas (línea delgada).

40 C: Se transfectó el clon celular etiquetado 1B2 en etapas posteriores con las funciones auxiliares virales, es decir el vector de expresión gagpol pCeB (Cosset *et al.*, J. Virol. 69:7430-7436, 1995) y pENVA-his (Spitzer *et al.*, J. Virol 77, 6070-6075, 2003), un vector de expresión de env anfotrópico. Se seleccionaron las células para integración estable. Se examinaron las células para detectar la expresión equilibrada de la función auxiliar gagpol y env, dando como resultado un alto título retroviral. La figura muestra la eficacia de la liberación de los retrovirus que transducen GFP de los subclones individuales (1B2-8-F, IIC2 y A-E) en comparación con la línea celular etiquetada 1 B2.

45 D: Se muestra la producción de virus del clon 1 B2-8F a lo largo del tiempo. Tal como se demuestra, la producción de virus es estable a lo largo de 12 semanas.

Figura 3:

50 Generación de una línea celular que produce virus terapéuticos

55 A: Se seleccionó el clon celular madre 1B2-8-F según el esquema representado. Se construyó un vector de direccionamiento en el que el vector de retrovirus que transduce colágeno VII terapéutico estaba flanqueado con los sitios FTR que no interaccionan y porta además un codón ATG y un elemento IRES adicional para iniciar la neoexpresión. Tras el direccionamiento, se obtiene la expresión de npt mediante iniciación de la traducción mediada por IRES a partir de una LTR derivada de ARN.

B. Se analizaron clones celulares resistentes a G418 obtenidos tras el direccionamiento del casete del vector retroviral para detectar la expresión de GFP. La superposición de histogramas muestra la expresión de GFP de clones resistentes a G418 en comparación con el clon 1B2-8-F original y células 293 como control.

5 C: Se confirmó el direccionamiento correcto mediante transferencia de tipo Southern de clones resistentes a G418. Para este fin, se digirió ADN cromosómico de la línea celular madre original 1B2-8-F e IIC2 y subclones independientes con SacI y se hibridó frente a una sonda de EMCV. El direccionamiento correcto dio como resultado un fragmento de 2 kb en clones seleccionados como diana correctamente y la eliminación de la señal original de 4 kb. Se llevó a cabo tal análisis para aproximadamente 50 subclones generados independientemente, mostrando más del 95% de los mismos intercambio dirigido correcto (no mostrado).

D: Se analizaron células seleccionadas como diana según la expresión de ColVII. Para este fin, se tiñeron inmunológicamente las células usando un anticuerpo contra hColVII. Como control, se tiñeron las células etiquetadas.

15 Figura 4:

A: se monitorizó la producción de virus. Se infectaron células NIH3T3 de ratón con el sobrenadante del virus de un subclón resistente a G418. Se tiñeron inmunológicamente las células infectadas y control para detectar hColVII.

20 B: Se monitorizó el título de virus ColVII tras dirigir el vector pMSIRcolVII a las células 1B2-8-F. Se aislaron clones resistentes a G418, se confirmó el intercambio dirigido mediante transferencia de tipo Southern (no mostrado) y se analizaron para determinar su producción de virus. La figura B muestra el título uniforme de subclones generados tras la transfección según el protocolo descrito en el ejemplo.

C: Se monitorizó el título retroviral de un subclón seleccionado como diana resistente a G418 individual a lo largo del tiempo. La figura C muestra la estabilidad del título a lo largo de 4 semanas.

25 Figura 5:

Intercambio del casete de etiquetado GFP por diferentes casetes

Se muestran el título de la línea celular original, M, y el título de los clones seleccionados como diana con pMSIReGFP, carriles 1 a 8, y de clones seleccionados como diana con pMLIReGFP, carriles a a e. Se obtuvieron títulos de virus altos y reproducibles en subclones independientes tras dirigir el casete de GFP etiquetado mediante recombinación con FIp.

30

Tabla 1:

Eficacia del intercambio dirigido y los títulos retrovirales tras el direccionamiento

En el lado izquierdo, se muestran los diversos constructos usados para experimentos de direccionamiento descritos en el ejemplo 3.

35 En el lado derecho, se ilustra la eficacia del direccionamiento con los diversos vectores. Se logra un direccionamiento altamente eficaz. Además, los clones obtenidos muestran un direccionamiento correcto con un título promedio muy alto.

### Descripción detallada de la invención

40 Se indica que tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen el significado indicado a continuación:

45 La expresión "nucleótido de interés, NOI" tal como se usa en el presente documento pretende significar una molécula de ácido nucleico que puede incluir ARNm eucariota, ADNc a partir de ARNm eucariota, secuencias genómicas de ADN eucariota y secuencias de ADN o ARN sintéticas. Preferiblemente, el NOI es una secuencia de ácido nucleico derivada de una secuencia de ADN o ARN humana. Por ejemplo, el NOI codifica para una molécula seleccionada del grupo que consiste en proteínas, péptidos, secuencias de ácido nucleico antisentido, ribozimas y ARNip.

50 La expresión "operativamente unido" tal como se usa en el presente documento pretende significar disposiciones de elementos en las que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función habitual. Por tanto, un promotor dado operativamente unido a una secuencia codificante puede efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando está presente la enzima apropiada.

El término "virus" se usa indistintamente con la expresión "partícula de virus" en la presente solicitud.

La expresión "célula (línea celular) que produce virus" tal como se usa en el presente documento pretende significar una célula que contiene todos los elementos necesarios para la producción de un virus o una partícula de virus, incluyendo todos los elementos cis necesarios para la producción de virus.

5 La expresión "línea celular" se refiere a una población de células isogénicas que pueden crecer y dividirse de manera continua *in vitro*.

10 La expresión "célula (línea celular) productora madre" tal como se usa en el presente documento pretende significar una célula o línea celular que contiene integrada de manera cromosómica al menos una secuencia que codifica para gag/pol, un casete de expresión que contiene secuencias que permiten la integración específica de sitio, secuencia(s) para un marcador de selección y un dominio de selección no funcional, y un casete de expresión diferente que preferiblemente pero no necesariamente contiene secuencias que permiten la integración específica de sitio, secuencia(s) para un marcador de selección diferente al marcador de selección en el otro casete de expresión y un dominio de selección no funcional.

15 La expresión "marcador de selección" tal como se usa en el presente documento pretende significar un marcador que permite la diferenciación de restos, como células, que pueden o no contener dicho marcador de selección. Por ejemplo, un marcador de selección puede ser la expresión de una molécula específica, un marcador de resistencia, como un marcador que confiere resistencia a fármacos a una célula, etc. Por tanto, el marcador de selección permite una preparación, fabricación, caracterización o pruebas más sencillas de la célula o línea celular.

20 La expresión "dominio de selección funcional" tal como se usa en el presente documento pretende significar un dominio que es funcional porque contiene un elemento que permite la selección de células. El dominio de selección funcional comprende al menos dos fragmentos de selección no funcionales.

25 Fragmentos de selección no funcionales significa que el elemento de selección no está presente en una forma funcional y, por tanto, no puede usarse para fines de selección entre diferentes células. Los "fragmentos de selección no funcionales" son fragmentos que no contienen todos los elementos necesarios para permitir la selección basada en el elemento de selección. La combinación de al menos dos fragmentos de selección no funcionales que se complementan da como resultado un dominio de selección funcional. El dominio de selección puede ser un marcador de selección tal como se indicó anteriormente, como un marcador de resistencia u otro marcador que permite la caracterización de las células. Además, el fragmento de selección no funcional puede ser un marcador de selección silencioso pero funcional. Es decir, el marcador de selección funcional no se transcribe debido a que falta un promotor o falta un potenciador o faltan secuencias iniciadoras de la traducción. Obsérvese que el marcador de selección del dominio de selección debe ser diferente al marcador de selección del casete de expresión presente en la línea celular productora madre.

La expresión "integración específica de sitio" tal como se usa en el presente documento pretende significar que la integración de elementos, como casetes de expresión, se realiza sólo en sitios predefinidos.

35 El término "etiquetado" tal como se usa en el presente documento pretende significar un estado en el que un sitio cromosómico está marcado genéticamente mediante integración de una secuencia de nucleótidos que permite la integración específica de sitio y la posterior selección.

El término "dirigido" tal como se usa en el presente documento pretende significar el estado de una secuencia de nucleótidos que se ha integrado en un sitio de manera específica en un sitio de integración cromosómico previamente etiquetado.

40 La presente invención se refiere a un método para la generación de una línea celular que produce virus que comprende las siguientes etapas:

a.) introducir en una línea celular productora madre un constructo de nucleótidos que comprende un casete de nucleótido de interés (NOI) que comprende:

45 i) al menos un NOI operativamente unido a un promotor;

ii) repeticiones terminales largas (LTR) ubicadas en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de la secuencia de NOI, respectivamente;

iii) un fragmento de selección no funcional la ubicado en el sentido de 3' de la LTR en 3' que permite la formación de un dominio de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario Ib presente en la línea celular productora madre; y

50 iv) secuencias que permiten la integración específica de sitio del casete NOI en un primer casete de expresión presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete NOI en ambos sitios de dicho casete; e

b.) introducir en la línea celular productora de células madre un constructo de nucleótidos que comprende un casete de expresión env que comprende

55 i) secuencia(s) de gen(es) env operativamente unida(s) a un promotor;

- 5 ii) un fragmento de marcador de selección no funcional IIa que permite la formación de un dominio de selección funcional II que puede ser idéntico o diferente del dominio de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario IIb presente en la línea celular productora madre, estando dicho fragmento de selección no funcional IIa ubicado en el sentido de 3' de la(s) secuencia(s) de gen(es) env;
- 10 iii) secuencias que permiten la integración específica de sitio de dicho casete env en un segundo casete de expresión etiquetado presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete env en ambos sitios de dicho casete;
- c.) iniciar el reemplazo del casete NOI y/o el casete env por el casete de expresión correspondiente presente en la línea celular productora madre;
- d.) seleccionar líneas celulares que han integrado de manera estable el casete NOI y/o el casete env basándose en el/los dominio(s) de selección funcional(es);
- en el que no se determina el orden de la etapa a.) y b.) y en el que las etapas c.) y d.) pueden llevarse a cabo tras cada una de las etapas a.) y b.) o tras llevar a cabo las etapas a.) y b.);
- 15 con la condición de que la línea celular productora madre usada en a.) y b.), respectivamente, pueda obtenerse
- I) integrando de manera estable un casete de expresión en el genoma de una célula huésped o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':
- 20 i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
- ii) un promotor;
- iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);
- iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
- 25 v) un fragmento de selección no funcional Ib;
- II) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (I) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de I);
- 30 III) integrando de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':
- i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
- ii) un promotor;
- 35 iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección B que es diferente del marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);
- iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
- v) un fragmento de selección no funcional IIb que puede ser igual o puede ser diferente al fragmento de selección Ib;
- 40 en el que las secuencias que permiten la integración específica de sitio pueden ser idénticas o pueden ser diferentes a dichas secuencias del casete de expresión de I);
- (IV) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (III) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de (III);
- 45 (V) integrando de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que contiene un promotor operativamente unido a una secuencia que codifica para gag/pol;
- (VI) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (V) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de V;
- 50

y en el que no se determina el orden de la integración de los diferentes casetes de expresión según (I), (III) y (V).

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la generación de una línea celular que produce virus que comprende las siguientes etapas:

- 5 a.) introducir en una línea celular productora madre un constructo de nucleótido que comprende un casete de nucleótidos de interés (NOI) que comprende:
- i) al menos un NOI operativamente unido a un promotor;
  - ii) repeticiones terminales largas (LTR) ubicadas en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de la secuencia de NOI, respectivamente;
  - 10 iii) un fragmento de selección no funcional la ubicado en el sentido de 3' de la LTR en 3' que permite la formación de un dominio de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario Ib presente en la línea celular productora madre; y
  - iv) secuencias que permiten la integración específica de sitio del casete NOI en un primer casete de expresión presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete NOI en ambos sitios de dicho casete; y opcionalmente
- 15 b.) introducir en la línea celular productora de células madre un constructo de nucleótidos que comprende un casete de expresión env que comprende
- i) secuencia(s) del/de los gen(es) env operativamente unida(s) a un promotor;
  - ii) un fragmento de selección no funcional IIa que permite la formación de un dominio de selección funcional II que puede ser idéntico o diferente del marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario IIb presente en la línea celular productora madre, estando dicho fragmento de selección no funcional IIa ubicado en el sentido de 3' de la(s) secuencia(s) del/de los gen(es) env;
  - 20 iii) secuencias que permiten la integración específica de sitio de dicho casete env en un casete de expresión env presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete env en ambos sitios de dicho casete;
- 25 c.) iniciar el reemplazo del casete NOI y/o el casete env con el casete de expresión correspondiente presente en la línea celular productora madre;
- d.) seleccionar líneas celulares que han integrado de manera estable el casete NOI y/o el casete env basándose en el/los dominio(s) de selección funcional(es);
- 30 en el que no se determina el orden de la etapa a.) y opcionalmente b.) y en el que la etapa c.) y d.) pueden llevarse a cabo tras cada una de las etapas a.) y b.) o tras llevar a cabo las etapas a.) y b.);
- con la condición de que la línea celular productora madre usada en a.) y b.), respectivamente, pueda obtenerse
- 35 I) integrando de manera estable un casete de expresión en el genoma de una célula huésped o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':
- i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
  - ii) un promotor;
  - 40 iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);
  - iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
  - v) un fragmento de selección no funcional Ib;
- 45 II) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (I) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de I);
- III) integrando de manera estable un casete de expresión env en el genoma de dicha célula o línea celular, dicho casete de expresión env comprende un constructo de nucleótidos que comprende:
- i) opcionalmente una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;

ii) un promotor;

iii) secuencia(s) del/de los gen(es) env operativamente unida(s) al promotor de ii);

iv) opcionalmente una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);

5 v) opcionalmente un fragmento de selección no funcional IIb que puede igual o puede ser diferente al fragmento de selección Ib;

en el que las secuencias que permiten la integración específica de sitio pueden ser idénticas o pueden ser diferentes a dichas secuencias del casete de expresión de I);

10 IV) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (III) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de (III);

V) integrando de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que contiene un promotor operativamente unido a una secuencia que codifica para gag/pol;

15 VI) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (V) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de V;

y en el que no se determina el orden de la integración de los diferentes casetes de expresión según (I), (III) y (V).

20 En una primera etapa, se produce una línea celular productora madre según las etapas (I) a (VI) de los métodos anteriores. Por supuesto, cuando se inicia el método con una célula o línea celular que ya contiene uno de los elementos que van a introducirse en la célula, sólo han de realizarse las etapas restantes.

Además, la integración de los diferentes casetes según (I), (III) y (V) puede llevarse a cabo al mismo tiempo. En particular, puede realizarse simultáneamente la integración del casete de expresión gag/pol y otro casete, en particular el casete de expresión env.

25 Con la primera fase, se produce una "línea celular productora madre". Esta línea celular productora madre se genera una vez que se proporciona en una primera realización de la presente invención una línea celular etiquetada que ha incorporado en su genoma un casete de expresión gag/pol y dos casetes de expresión que contienen cada uno un marcador de selección. En una segunda realización, el método según la presente invención proporciona una línea celular etiquetada que ha incorporado en su genoma un casete de expresión gag/pol, un  
30 casete de expresión env que puede sustituirse opcionalmente y un casete de expresión adicional que contienen un marcador de selección reemplazable.

Por tanto, la línea celular productora madre representa una línea celular seleccionada para la expresión optimizada de los diversos casetes de expresión. Las etapas de selección han de realizarse sólo una vez para cada casete de expresión etiquetado en la línea celular.

35 En la segunda fase según el método de la presente invención, se selecciona como diana la línea celular madre con el NOI y el gen env de interés si la línea celular productora madre contiene dos casetes de expresión que contienen dos marcadores de selección diferentes. En otra realización, se selecciona como diana la línea celular madre con el NOI y opcionalmente un gen env de interés si la línea celular productora madre contiene un casete de expresión que contiene un marcador de selección y un segundo casete de expresión que contiene un gen env.

40 Es decir, la segunda fase comprende un reemplazo del casete génico en la que el reemplazo del casete génico tiene lugar en los sitios previamente etiquetados, las secuencias de integración específica de sitio, en el genoma de la línea celular productora madre. Por tanto, el/los casete(s) se integra(n) en los locus cromosómicos etiquetados de la línea celular productora madre. La integración del/de los casete(s) de interés en los sitios conocidos particulares da como resultado líneas celulares que producen virus que tienen una expresión óptima de los casetes dirigidos. Además, dado que el reemplazo tiene lugar en los sitios que permiten la integración específica  
45 de sitio en el genoma del huésped, no es necesaria ninguna etapa de selección laboriosa. En particular, el/los casete(s) de expresión introducido(s) no se integrará(n) de manera aleatoria en el genoma del huésped sino específicamente en los locus cromosómicos etiquetados que tienen los sitios de integración específica de sitio. En consecuencia, en la línea celular productora de virus final los sitios cromosómicos en los que se integran los componentes auxiliares y el vector retroviral son idénticos a los sitios correspondientes de la línea celular productora madre. Por tanto, la línea celular productora de virus final tendrá exactamente las mismas propiedades que la línea celular productora madre, en particular en vista de la eficacia de la producción de virus, las condiciones de fermentación y las características de seguridad. Además, la tasa de direccionamiento correcto del casete es del 95% al 100%, preferiblemente del 97% al 100%. Esto significa que casi todos los clones obtenidos tras la etapa de  
50 direccionamiento contienen un casete de reemplazo correctamente dirigido.  
55

Además, la presencia de las secuencias LTR en el casete NOI permite la producción de un genoma viral recombinante que no contiene ninguna secuencia adicional, por ejemplo secuencias que codifican para un marcador de selección, como resistencia a antibióticos, etc. El casete NOI y también el casete env no contienen ningún gen que codifica para un marcador de selección dentro de la LTR sino que los fragmentos de los dominios de selección preestablecidos en los casetes están fuera de las secuencias de LTR, por tanto, dichas secuencias de marcador de selección no estarán presentes en el virus. Además, el virus no contiene secuencias adicionales derivadas de la etapa de reemplazo, como secuencias que permiten la integración específica de sitio, por ejemplo un sitio loxP o un sitio FRT. Por tanto, el virus o partícula de virus producida según el método de la presente invención está libre de componentes adicionales que puedan afectar de manera adversa a los beneficios terapéuticos del NOI. Está dentro del alcance de la presente invención que puedan sustituirse las secuencias de LTR por secuencias que tienen la misma función, es decir, que permiten la generación del vector viral que contiene el NOI.

En más detalle, la primera fase que da como resultado una línea celular productora madre comprende las etapas de etiquetar sitios de integración cromosómica integrando los diferentes casetes de expresión en el genoma del huésped y seleccionando células apropiadas. Al menos uno de los diferentes casetes de expresión introducidos en el genoma comprende las secuencias en el sitio 5' del casete que permite la integración específica de sitio, además, un promotor adicional está presente en el sentido de 3' del sitio 5' anteriormente mencionado. El promotor adicional está operativamente unido con una secuencia que codifica para un marcador de selección A y B, respectivamente. Los marcadores de selección A y B son diferentes entre sí. El al menos un casete que tiene un sitio de integración específica de sitio en el extremo 5' también contiene en el sitio 3' una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio. Adicionalmente en el sentido de 5', está presente un fragmento de selección no funcional lb y lb, respectivamente. Los sitios de integración específica de sitio en el extremo 5' y el extremo 3' son diferentes entre sí.

Con "secuencias que permiten la integración específica de sitio" quiere decirse secuencias que permiten un intercambio por reemplazo del casete integrado en el genoma del huésped, el casete etiquetado, por un casete diferente, el casete de direccionamiento, que debe integrarse en el genoma mediante el reemplazo del casete etiquetado integrado. Preferiblemente, se usa un mecanismo asistido por recombinasa para el intercambio por reemplazo. Este sistema facilita el intercambio. De los sistemas de recombinasa conocidos, los sitios de reconocimiento recombinasa Cre/loxP del bacteriófago P1 o la recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae* son los que se usan más frecuentemente.

En la técnica se conoce bien el procedimiento general llevado a cabo en la primera fase para establecer una línea celular transducida o línea celular productora madre que contiene tres casetes etiquetados, es decir el casete gag/pol, un casete env y un tercer casete de expresión que contienen el NOI. La selección de las líneas celulares productoras madre conocidas se basa en diversas características de expresión como la expresión de un marcador de selección, introducido dentro del casete de etiquetado. Criterios adicionales para la selección de una línea celular apropiada son un nivel de expresión óptimo que es estable a lo largo del tiempo, el mantenimiento de las condiciones de fermentación, el crecimiento celular, la estabilidad genómica del sitio de integración y características de seguridad. Sin embargo, se conocen bien en la técnica la integración específica del casete de expresión que contiene el marcador de selección en combinación con el dominio de selección no funcional y las secuencias para la integración específica de sitio.

No se determina el orden de la integración de los casetes de expresión según las etapas (I), (III) y (V). Es decir, puede comenzarse con la integración del primer casete gag/pol. Además, si ya están presentes líneas celulares que tienen al menos uno de los casetes de las etapas (I), (III) y (V) integrados de manera estable en su genoma, pueden usarse dichas líneas celulares para la integración adicional de los casetes aún no integrados en el genoma. Además, al menos dos casetes pueden integrarse simultáneamente. En particular, es posible introducir el casete gag/pol y otro casete de expresión, en particular, el casete env, al mismo tiempo para su integración en el genoma celular.

El casete de expresión que va a integrarse en las etapas (I) y/o (III) comprende al menos los siguientes elementos:

Elementos de integración específica de sitio en el extremo 5' y 3' de la secuencia de marcador de selección. Estos elementos incluyen sitios de reconocimiento para enzimas que permiten el intercambio específico para las secuencias flanqueadas por los mismos sitios de reconocimiento en la secuencia de nucleótidos integrada de manera cromosómica específica. Un ejemplo típico de este sistema es el sistema de recombinasa FLP de levadura. Para evitar la delección del producto integrado en un punto de tiempo posterior, se prefiere usar dos sitios de recombinación que no interaccionan en el extremo 5' y en el extremo 3'.

Un promotor y/u otro elemento (por ejemplo un elemento IRES) para permitir la transcripción y/o la traducción del marcador de selección.

Un marcador de selección. El marcador de selección puede ser un marcador de resistencia a fármacos como neomicina fosfotransferasa, un marcador de expresión dentro de la célula (por ejemplo GFP,  $\beta$ -galactosidasa) o en su superficie (por ejemplo, receptores) o éste puede ser la propia proteína env.

Un fragmento de selección no funcional. Este fragmento de selección no funcional representa un marcador de selección incompleto, por ejemplo un marcador de resistencia a fármacos. Dado que el fragmento representa un dominio incompleto, no es posible la selección basándose en este marcador de selección específico, sino que requiere que se complete con al menos un fragmento de selección no funcional adicional. Este fragmento adicional se suministra más tarde mediante la integración del NOI y/o el casete env según las etapas a) y/o b) respectivamente, por tanto, sólo la integración específica y precisa en la etapa c) del procedimiento reivindicado hace que la célula esté en una posición que pueda seleccionarse basándose en el marcador de selección presente en el dominio de selección.

Tal como se indicó anteriormente, las secuencias que permiten la integración específica de sitio en el sitio 5' y 3' de los casetes preferiblemente no interactúan. El uso de diferentes secuencias evita la escisión no deseada del inserto. Además, las secuencias para la integración específica de sitio pueden ser idénticas o pueden ser diferentes en los casetes de la etapa (I) y (III). Preferiblemente, dichas secuencias son diferentes entre sí. Por tanto, se lleva a cabo la integración o el intercambio específico de sólo un casete.

El procedimiento de selección para seleccionar células transducidas que han integrado de manera cromosómica el casete deseado se lleva a cabo según técnicas bien conocidas que tienen en cuenta la característica deseada de las células transducidas, como producción a alto nivel, estabilidad y seguridad.

La primera fase del método según la presente invención da como resultado una línea celular transducida o línea celular productora madre que ha integrado de manera cromosómica habitualmente al menos tres casetes. Los sitios de integración se denominan también locus cromosómicos etiquetados. Esta línea celular se selecciona para los parámetros deseados, como estabilidad de los casetes integrados, seguridad, producción a alto nivel si es aplicable, etc. Cuando se usa la proteína env como uno de los marcadores de selección A o B, las células resultantes tienen todos los elementos genéticos requeridos para la producción de virus recombinante. Además, si se usa una secuencia que codifica para la proteína env para la generación de la línea celular madre, en la que la secuencia que codifica para la proteína env representa la secuencia que codifica para el marcador de selección o bien A o bien B, el casete env etiquetado no contiene necesariamente secuencias en el extremo 5' y 3' que permiten la integración específica de sitio.

En la segunda fase, se establece la línea celular que produce virus. Usando sitios de integración específica de sitio que son idénticos a los sitios de integración específica de sitio presentes en los casetes integrados de manera cromosómica, es posible reemplazar específicamente el casete presente en la línea celular productora madre por el NOI y, opcionalmente, el casete env.

El uso de la línea celular productora madre permite una eficacia de integración específica de sitio de más del 95%. Además, se mantienen las características de expresión tras el intercambio del marcador de selección etiquetado introducido en la primera fase por el NOI y/o casete env. Además, los diferentes clones obtenidos en la segunda fase del método según la presente invención demuestran un título que es estable y predecible en todos los subclones.

El casete NOI o el casete env introducido en la segunda fase del método según la presente invención comprenden los sitios de integración específica de sitio en el lado 5' y 3' que flanquean a los casetes. Estos sitios de integración específica de sitio son idénticos a al menos uno de los sitios de integración específica de sitio presentes en los casetes de expresión que están integrados de manera cromosómica en la línea celular productora madre. Además, los casetes introducidos durante la segunda fase contienen un fragmento de selección no funcional que permite la formación de un dominio de selección funcional cuando se combina con el fragmento complementario presente en los locus cromosómicos etiquetados.

La formación de un dominio de selección funcional proporciona un procedimiento de selección extremadamente eficaz para el reemplazo del casete correcto. Por tanto, se evita un trabajo de selección laborioso aunque sólo pueden seleccionarse células en las que tuvo lugar el reemplazo del casete correcto basándose en el dominio de selección funcional.

El dominio de selección funcional contiene un marcador de selección, como un marcador de selección de resistencia a fármacos, antibióticos, etc. Por ejemplo, el locus cromosómico etiquetado de la línea celular productora madre abarca la secuencia para codificar para la resistencia a fármacos excepto el codón de iniciación o la secuencia promotora. Complementando el fragmento con el fragmento de selección no funcional presente en el casete de direccionamiento (NOI y/o casete env), se introduce el promotor o el codón de iniciación en marco que falta, proporcionando así un dominio de selección funcional que puede usarse para fines de selección.

El sistema descrito anteriormente supera el trabajo laborioso y que requiere mucho tiempo para la selección de clones adecuados. Además, el método según la presente invención permite el uso de la línea celular productora madre para la producción de una variedad de diferentes líneas celulares que producen virus para la producción de virus que tienen diferentes proteínas env o que contienen un vector viral que codifica para diferentes nucleótidos de interés, por ejemplo diferentes genes terapéuticos, etc., permitiendo la expresión de proteínas terapéuticamente útiles en la célula diana.

Además, es posible un pseudotipado sencillo y rápido del virus. El término pseudotipado significa incorporar en al menos una parte de, o sustituir al menos una parte de, o reemplazar la totalidad de, un gen env de un genoma

viral por un gen env heterólogo, por ejemplo un gen env de otro virus. El pseudotipado puede mejorar la estabilidad del vector viral y la eficacia y especificidad de la transducción.

5 Si es necesario, los casetes introducidos en la célula o línea celular contienen un promotor que está operativamente unido con el marcador de selección o el NOI o la secuencia env. El promotor puede seleccionarse de secuencias promotoras conocidas que incluyen promotores constitutivos (por ejemplo CMV y promotores para la expresión restringida (controlada) en el tiempo (por ejemplo promotores dependientes de tTA, controlables por Tet).

Sin embargo, no es necesario un promotor adicional además de las secuencias de LTR, dado que la propia LTR representa una estructura que promueve la transcripción de las secuencias en el sentido de 3' de la secuencia de LTR, probablemente mediante transcripción por translectura.

10 Por tanto, el casete NOI comprende adicionalmente todos los elementos cis retrovirales genéticos requeridos para el empaquetamiento apropiado del ARN, la transcripción inversa y la integración, por ejemplo repetición terminal larga (LTR) flanqueante. Las LTR son responsables de la integración proviral y de la transcripción. También sirven como secuencias potenciadoras-promotoras. Es decir, las LTR pueden controlar la expresión de los genes terapéuticos recombinantes. El flanqueo de la secuencia de NOI por las LTR permite la producción de vectores virales que no contienen ninguna secuencia adicional que codifica para una molécula que puede afectar de manera adversa a la eficacia terapéutica del virus. En particular, el vector viral no contiene ninguna secuencia que codifica para un marcador de selección u otras moléculas necesarias durante el proceso de producción del virus. Los elementos cis retrovirales incluyen las repeticiones terminales largas retrovirales, el sitio de unión del cebador, la señal de empaquetamiento y el tramo de polipurinas (PPT).

20 En una realización preferida, el promotor al que está operativamente unido el NOI y/o el gen env, es la secuencia de LTR ubicada en el sentido de 5' del NOI y env, respectivamente. En otra realización preferida, por ejemplo cuando se prepara un vector SIN, está presente una secuencia promotora adicional en el casete NOI y env, respectivamente, por ejemplo uno de los promotores mencionados anteriormente.

25 En una realización preferida adicional, el vector viral producido por la línea celular que produce virus es un vector retroviral autoinactivante (SIN). Los vectores SIN tienen una región U3 modificada de la LTR en 3' en la que se delecionan los potenciadores transcripcionales conduciendo a un promotor de LTR no funcional tras la transcripción inversa y la integración del casete viral en el genoma del huésped. Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, el casete NOI que va a integrarse según la presente invención tiene una secuencia de LTR en 3' modificada, una denominada SIN LTR.

30 En un método preferido según la presente invención, se transducen los casetes de expresión de las etapas (I) y (III) mediante transferencia génica retroviral y por tanto contienen una LTR en 5' y una LTR en 3'. En la región U3 de la LTR en 3', puede integrarse el fragmento de selección no funcional. Además, la LTR en 3' contiene sitios de integración específica de sitio. Como consecuencia del proceso de infección retroviral, se duplica el inserto del inserto U3 en 3' al U3 de la LTR en 5', flanqueando de ese modo los casetes de expresión con sitios de integración específica de sitio.

40 Alternativamente, se realiza la introducción de los casetes que van a integrarse en las células mediante métodos de transfección no retroviral que conoce bien el experto. Por ejemplo, la introducción de los casetes puede comprender infección con vectores virales, transfección con liposomas también denominado lipofección, transfección usando la técnica de fosfato de calcio bien conocida o electroporación. Transfección generalmente se refiere a la captación de ADN foráneo por una célula.

45 El reemplazo de los casetes de expresión entregados en la línea celular productora madre según las etapas (I) y (III) se lleva a cabo por ejemplo con la ayuda de una recombinasa o una enzima de restricción. Es decir, la enzima necesaria para promover o catalizar el intercambio es por ejemplo la recombinasa Cre o la recombinasa FLP o cualquier otra recombinasa conocida en la técnica. Alternativamente, el intercambio puede promoverse usando enzimas de restricción específicas como SCEI.

Los genes, que codifican para las enzimas anteriormente mencionadas pueden introducirse en las células mediante transfección o infección de vectores de expresión apropiados. La transfección puede ser una transfección estable o una transitoria. Además, el sistema de recombinasa puede ser un sistema inducible. Alternativamente, la enzima como tal puede proporcionarse directamente en el sistema de cultivo celular.

50 La selección de las líneas celulares que han integrado de manera estable el casete NOI y/o el casete env se lleva a cabo basándose en la expresión de los marcadores de selección presentes en el dominio de selección. Debido al reemplazo de los casetes, se ensamblan ambos fragmentos de dominio de selección no funcional para dar como resultado un dominio de selección funcional. En particular, el suministro de uno de los fragmentos de selección no funcionales necesarios para completar el fragmento de selección no funcional en el locus cromosómico etiquetado proporciona un marcador de selección, por ejemplo un gen marcador de resistencia a fármacos que tiene actividad funcional sólo en células en las que tuvo lugar un intercambio de casetes. Por tanto, la selección es un proceso fácil y fiable que supera el trabajo laborioso y que requiere mucho tiempo que es necesario para seleccionar clones.

Además, dado que el proceso mantiene y no afecta a la estructura de los sitios de integración cromosómica, la expresión del NOI tendrá las mismas características de expresión que el gen marcador en la línea celular productora madre.

5 La presente invención se refiere además a la propia línea celular que produce virus. La célula que produce virus según la presente invención permite la producción de un virus o una partícula de virus que contiene un vector viral. De manera importante, este vector no necesita contener ninguna secuencia codificante que pueda afectar de manera adversa a los beneficios terapéuticos del NOI. Proporcionando una LTR en 5' y una LTR en 3' en el sentido de 5' y en el sentido 3' de la secuencia de NOI, respectivamente, junto con los elementos de actuación en cis conocidos, psi y el tramo de polipurina requerido para el empaquetamiento y la transcripción inversa, es posible obtener un vector viral que contiene sólo la secuencia de NOI. Este vector viral se empaqueta en el virus que puede usarse posteriormente para infectar la célula diana. En una realización preferida particular, el vector viral es un vector retroviral autoinactivante.

15 Dentro del alcance de la presente invención, está el virus que puede obtenerse con el método reivindicado. El virus se caracteriza porque tiene un vector viral que no contiene ninguna secuencia adicional cuyo producto pueda afectar de manera adversa a los beneficios terapéuticos del NOI presente en el vector viral. En particular, el virus según la presente invención no necesita codificar para un marcador de selección que va usarse durante el proceso de producción para la generación del virus.

20 Por tanto, el virus según la presente invención es particularmente útil en terapia génica. Por tanto, la presente invención se refiere también a métodos para tratar pacientes usando el virus según la presente invención. Además, la presente invención se refiere a una preparación terapéutica o farmacéutica para su uso en terapia génica. El experto es muy consciente de la composición que contiene el virus como principio activo.

25 Preferiblemente, el virus es un retrovirus, por ejemplo lentivirus o retrovirus de ratón. En particular los retrovirus incluyen: virus de tipo C de mamífero como virus de la leucemia murina de Moloney (VLM-Mo), virus del sarcoma de Moloney (VSM-Mo), virus de la leucemia murina de Abelson (VLM-A), virus de tipo B de mamífero como virus de tumor mamario de ratón (VTMR), virus de la leucosis-sarcoma aviar como virus del sarcoma de Rous (VSR) y virus del sarcoma de Fujinami (VSFu), lentivirus como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), espumavirus y virus de la leucemia de células T humanas HTLV.

30 El env introducido en la línea celular productora madre para llegar a una línea celular que produce virus según la presente invención puede ser el env obtenido del mismo virus que las proteínas gag pol. Alternativamente, puede usarse una proteína env de un virus heterólogo, cuando se pseudotipa el virus. El pseudotipado puede mejorar la estabilidad viral y la eficacia de la transducción, la especificidad de la transducción tal como se explicó anteriormente. Las proteínas env que van a usarse en el método según la presente invención pueden incluir env 10A1, 4070A, env ecotrópica, env de GALV, RD114 y LMCV, y env genéticamente modificadas por ejemplo que confieren estabilidad al complemento, o tipos de células específicas diana y env quiméricas.

35 Además, las líneas celulares productoras madre que producen proteínas tóxicas o dañinas como VSV-G pueden establecerse usando casetes de expresión que proporcionan una expresión restringida (condicional) en el tiempo de la proteína.

40 En el método según la presente invención la célula huésped usada para la producción de la línea celular productora madre puede seleccionarse del grupo que consiste en células de mamífero como HT1080, HEK293, líneas celulares inmortalizadas por Tert, etc. El experto es muy consciente de las células o líneas celulares adecuadas que pueden usarse para la producción de la línea celular productora madre y la generación de la línea celular que produce virus según la presente invención.

45 La presente invención también proporciona el uso de un vector viral, en particular de un vector retroviral, de la invención en la fabricación de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede usarse para administrar un NOI a una célula diana que necesita el mismo. En particular, la composición farmacéutica puede usarse en terapia génica. La composición puede contener opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La composición puede contener adicionalmente componentes farmacéuticos conocidos como aglutinantes, etc.

## 50 Ejemplos

### Ejemplo 1 Generación de una línea celular productora madre

#### Etapa a Etiquetado de células con un casete indicador de GFP

55 Se construyó un vector de etiquetado retroviral pROL. Este vector contiene LTR derivadas de MSCV y transduce un casete de expresión bicistrónico que comprende GFP (proteína fluorescente verde) e higromicina B fosfotransferasa. Además, en la LTR en 3' (sitio Nhel) se integraron dos sitios FTR que no interactúan y una secuencia que comprende un gen de neomicina fosfotransferasa no funcional, deficiente en ATG (véase la figura 2a, carril superior para un dibujo esquemático del vector). Este vector (pROL) se transfectó de manera estable en la línea celular de empaquetamiento PG13 tal como se describe en Spitzer *et al.*, Hum Gene Ther. 10, 1893-1902

(1999). En resumen, se transfectaron 5 µg de pROL a  $1 \times 10^5$  células. Se seleccionaron las células para resistencia a higromicina (200 U/ml). Se determinó el título de GFP. Posteriormente, se infectaron  $1 \times 10^5$  células HEK293 en presencia de polibreno 8 µg/ml tal como se describe en Spitzer *et al.*, Hum Gene Ther. 10, 1893-1902 (1999), aplicando de ese modo una multiplicidad de infección por debajo de 0,01. Dos días tras la infección, se seleccionaron las células para resistencia a higromicina. Se aislaron células resistentes a higromicina con expresión de GFP óptima mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (figura 2b).

#### Etapas b Integración de env y gag/pol

Se comprobó que los clones de alta expresión de GFP tenían una integración de una única copia mediante análisis de transferencia de tipo Southern. Posteriormente, se transfectaron conjuntamente clones individuales de manera secuencial con las funciones auxiliares. Para este fin, se transfectaron 5 µg del vector de expresión de env anfotrópico pENVA-his (Spitzer *et al.*, J. virol 77, 6070-6075 (2003)) a  $3 \times 10^5$  células del clon celular etiquetado. Se seleccionaron las células en medio que contenía histidinol 11 mM y se confirmó la expresión de env en los clones aislados mediante citometría de flujo. Entonces, se transfectó pCeB, un vector de expresión de gag/pol que confiere resistencia a blastidina (Cosset, *et al.* J. Virol. 69:7430-7436 (1995)), usando de nuevo 5 µg del vector y  $3 \times 10^5$  células. Se caracterizaron adicionalmente los clones celulares resistentes a blastidina 3 µg/ml. Se examinaron los clones para detectar la máxima producción de retrovirus que transducen GFP (figura 2c). Se monitorizaron los clones celulares individuales para detectar la producción de retrovirus estable. La figura 2d muestra la producción de virus a partir del clon 1 B2-8F. En este ejemplo, el segundo constructo de expresión (envA) no es intercambiable.

#### **Ejemplo 2 Generación de una línea celular productora de virus**

##### Intercambio del casete de etiquetado GFP por un casete de expresión de colágeno

Se integró un vector terapéutico según la figura 3a. Se transfectaron conjuntamente 2 µg del vector de direccionamiento pMSIRcolVII (que contenía un vector retroviral basado en VLM que transducía ADNc de ColVII humano) con 10 µg de un vector que codificaba para recombinasa Flp pSVFlpe usando coprecipitación de ADN/fosfato de calcio en  $3 \times 10^5$  células HEK293 en placas de 6 pocillos tal como se describe en Spitzer *et al.*, Hum Gene Ther. 10, 1893-1902 (1999). Se renovó el medio 6 horas tras la transfección. Se incubaron las células durante 4 días para permitir que tuviese lugar el proceso de direccionamiento, y entonces se sembraron de  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  células en placas de cultivo de 10 cm y se dispusieron bajo presión de selección de G418 (1000 µg/ml) durante al menos dos semanas. Se aislaron clones celulares individuales y se confirmó el direccionamiento correcto mediante la pérdida de la expresión de GFP (figura 3b) y análisis de transferencia de tipo Southern (figura 3c). La inmunotinción frente a ColVII mostró una señal específicamente en las células seleccionadas como diana (figura 3d).

##### Título estable de células con células correctamente seleccionadas como diana

Se usó el sobrenadante de virus de células seleccionadas como diana con ColVII para infectar células NIH3T3 en presencia de polibreno 8 µg/ml (Spitzer *et al.*, Hum Gene Ther. 10, 1893-1902 (1999)). Se documentó la expresión de ColVII mediante inmunotinción usando un anticuerpo frente a ColVII (figura 4a). Se analizó la producción de virus tras el direccionamiento. La figura 4b muestra el título de virus de clones celulares independientes obtenidos tras el direccionamiento y la selección para resistencia a G418. De manera importante, todos los subclones seleccionados como diana analizados muestran un título constante (figura 4b) y estable (figura 4c) durante al menos 4 semanas, lo que demuestra que este método conduce a una producción de virus predecible y estable.

#### **Ejemplo 3 Optimización del diseño del vector retroviral**

##### Intercambio del casete de etiquetado GFP por casetes GFP alternativos

Para evaluar la eficacia de la producción de virus, se integraron diferentes vectores de GFP según la figura 3a. Los vectores se resumen en la tabla 1. En este experimento, se incluyeron LTR derivadas tanto de MSCV como de VLM así como un vector autoinactivante con un promotor eFa interno. Se transfectaron conjuntamente 2 µg de los vectores de direccionamiento pMSIReGFP, pMLIREGFP y pSINeGFP (tabla 1), respectivamente, con 10 µg de un vector que codificaba para recombinasa Flp pSVFlpe usando coprecipitación de ADN/fosfato de calcio en  $3 \times 10^5$  células HEK293 en placas de 6 pocillos tal como se describe en Spitzer *et al.*, Hum Gene Ther. 10, 1893-1902 (1999). Se renovó el medio 6 horas tras la transfección. Se incubaron las células durante 4 días para permitir que tuviese lugar el proceso de direccionamiento, y entonces se sembraron de  $1 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  células en placas de cultivo de 10 cm y se dispusieron bajo presión de selección de G418 (1000 µg/ml) durante al menos dos semanas. Se aislaron clones celulares individuales y se confirmó el direccionamiento correcto mediante análisis por transferencia de tipo Southern (no mostrado). Se determinó el título (tabla 1). La figura 5A muestra el título de la línea celular original (M) así como el título de los clones seleccionados como diana con pMSIReGFP (carriles 1 a 8) y los clones seleccionados como diana con pMLIREGFP (carriles a a e).

El resultado de los experimentos de direccionamiento se resume en la tabla 1. Muestra que el direccionamiento es altamente eficaz y que se obtienen altos títulos a partir de vectores de direccionamiento diseñados de manera diferente incluyendo vectores autoinactivantes.

Eficacia de direccionamiento [clones obtenidos]	Analizado/correc-tamente dirigido	Título promedio [ip/1*10 <sup>6</sup> células * 24 h]
80 - 100	12/12	8,1*10 <sup>6</sup> ± 1,5*10 <sup>6</sup>
20 - 30	10/10	2,5*10 <sup>7</sup> ± 1,3*10 <sup>7</sup>
50-80	12/12	1,2*10 <sup>6</sup> ± 1,8*10 <sup>5</sup>
15 - 20	11/11	1,2*10 <sup>5</sup> ± 2,1*10 <sup>4v</sup>
40 - 50	18/18	1,2*10 <sup>6</sup> ± 2,0*10 <sup>5</sup>

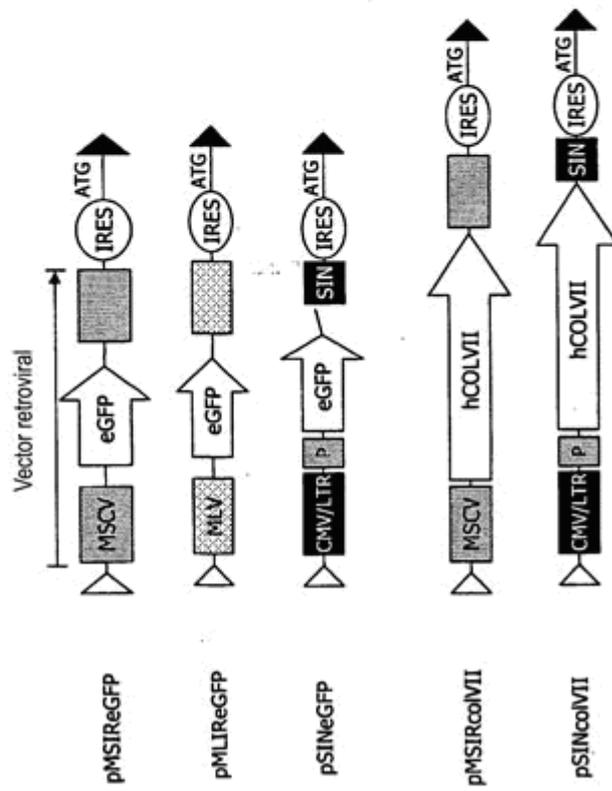


Tabla 1

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la generación de una línea celular que produce virus que comprende las siguientes etapas:

a.) introducir en una línea celular productora madre un constructo de nucleótidos que comprende un casete de nucleótidos de interés (NOI) que comprende:

- 5 i) al menos un NOI operativamente unido a un promotor;
- ii) repeticiones terminales largas (LTR) ubicadas en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de la secuencia de NOI, respectivamente;
- 10 iii) un fragmento de marcador de selección no funcional la ubicado en el sentido de 3' de la LTR en 3' que permite la formación de un marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento de marcador complementario Ib presente en la línea celular productora madre; y
- iv) secuencias que permiten la integración específica de sitio del casete NOI en un primer casete de expresión presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete NOI en ambos sitios de dicho casete; e

15 b.) introducir en la línea celular productora de células madre un constructo de nucleótidos que comprende un casete de expresión env que comprende

- i) secuencia(s) del/de los gen(es) env operativamente unida(s) a un promotor;
- 20 ii) un fragmento de marcador de selección no funcional IIa que permite la formación de un marcador de selección funcional II que puede ser idéntico o diferente del marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento de marcador complementario IIb presente en la línea celular productora madre, estando dicho fragmento de marcador de selección no funcional IIa ubicado en el sentido de 3' de la(s) secuencia(s) del/de los gen(es) env;
- 25 iii) secuencias que permiten la integración específica de sitio de dicho casete env en un segundo casete de expresión etiquetado presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete env en ambos sitios de dicho casete;

c.) iniciar el reemplazo del casete NOI y/o el casete env por el casete de expresión correspondiente presente en la línea celular productora madre;

30 d.) seleccionar líneas celulares que han integrado de manera estable el casete NOI y/o el casete env basándose en el/los marcador(es) de selección funcional(es);

en el que no se determina el orden de la etapa a.) y b.) y en el que las etapas c.) y d.) pueden llevarse a cabo tras cada una de las etapas a.) y b.) o tras llevar a cabo las etapas a.) y b.);

con la condición de que la línea celular productora madre usada en a.) y b.), respectivamente, pueda obtenerse

35 I) integrando de manera estable un casete de expresión en el genoma de una célula huésped o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':

- i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
- ii) un promotor;
- 40 iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);
- iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
- 45 v) un fragmento de marcador de selección no funcional Ib que permite la formación de un marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario la presente en el casete NOI;

II) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (I) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de I);

III) integrando de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':

- 5
- i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
  - ii) un promotor;
  - iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección B que es diferente del marcador de selección A, dicha secuencia esta operativamente unida con el promotor de ii);
- 10
- iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
  - v) un fragmento de marcador de selección no funcional Ib que permite la formación de un marcador de selección funcional II cuando se combina con el fragmento complementario Ila presente en el casete de expresión env que puede ser igual o puede ser diferente al fragmento de marcador de selección Ib;

15 en el que las secuencias que permiten la integración específica de sitio pueden ser idénticas o pueden ser diferentes a dichas secuencias del casete de expresión de I);

IV) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (III) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de (III);

20 V) integrando de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que contiene un promotor operativamente unido a una secuencia que codifica para gag/pol;

25 VI) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (V) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de V;

y en el que no se determina el orden de la integración de los diferentes casetes de expresión según (I), (III) y (V) y en el que el marcador de selección I y II son diferentes de A o B.

2. Método para la generación de una línea celular que produce virus que comprende las siguientes etapas:

30 a.) introducir en una línea celular productora madre un constructo de nucleótidos que comprende un casete de nucleótidos de interés (NOI) que comprende:

- i) al menos un NOI operativamente unido a un promotor;
- ii) repeticiones terminales largas (LTR) ubicadas en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de la secuencia de NOI, respectivamente;
- 35 iii) un fragmento de selección no funcional Ia ubicado en el sentido de 3' de la LTR en 3' que permite la formación de un dominio de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario Ib presente en la línea celular productora madre; y
- iv) secuencias que permiten la integración específica de sitio del casete NOI en un primer casete de expresión presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete NOI en ambos sitios de dicho casete; y opcionalmente

40 b.) introducir en la línea celular productora de células madre un constructo de nucleótidos que comprende un casete de expresión env que comprende

- i) secuencia(s) de gen(es) env operativamente unida(s) a un promotor;
- 45 ii) un fragmento de marcador de selección no funcional Ila que permite la formación de un marcador de selección funcional II que puede ser igual o diferente del marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento de marcador complementario IIb presente en la línea celular productora madre, estando dicho fragmento de marcador de selección no funcional Ila ubicado en el sentido de 3' de la(s) secuencia(s) de gen(es) env;
- 50 iii) secuencias que permiten la integración específica de sitio de dicho casete env en un casete de expresión env presente en dicha línea celular productora madre, dichas secuencias flanquean el casete env en ambos sitios de dicho casete;

c.) iniciar el reemplazo del casete NOI y/o el casete env por el casete de expresión correspondiente presente en la línea celular productora madre;

d.) seleccionar líneas celulares que han integrado de manera estable el casete NOI y/o el casete env basándose en el/los dominio(s) de selección funcional(es);

5 en el que no se determina el orden de la etapa a.) y opcionalmente b.) y en el que la etapa c.) y d.) pueden llevarse a cabo tras cada una de las etapas a.) y b.) o tras llevar a cabo las etapas a.) y b.);

con la condición de que la línea celular productora madre usada en a.) y b.), respectivamente, pueda obtenerse

10 I) integrando de manera estable un casete de expresión en el genoma de una célula huésped o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':

i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;

ii) un promotor;

15 iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);

iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);

20 v) un fragmento de marcador de selección no funcional Ib que permite la formación de un marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario la presente en el casete NOI;

II) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (I) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de I);

25 III) integrando de manera estable un casete de expresión env en el genoma de dicha célula o línea celular, dicho casete de expresión env comprende un constructo de nucleótidos que comprende:

i) opcionalmente una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;

ii) un promotor;

iii) secuencia(s) de gen(es) env operativamente unida(s) al promotor de ii);

30 iv) opcionalmente una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);

35 v) opcionalmente un fragmento de marcador de selección no funcional IIb que permite la formación de un marcador de selección funcional II cuando se combina con el fragmento complementario IIa presente en el casete de expresión env que puede ser igual o puede ser diferente al fragmento de marcador de selección Ib;

en el que las secuencias que permiten la integración específica de sitio pueden ser idénticas o pueden ser diferentes a dichas secuencias del casete de expresión de I);

40 (IV) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (III) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de (III);

(V) integrando de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que contiene un promotor operativamente unido a una secuencia que codifica para gag/pol;

45 (VI) seleccionando una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (V) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de V;

y en el que no se determina el orden de la integración de los diferentes casetes de expresión según (I), (III) y (V) y en el que el marcador de selección I y II son diferentes al marcador de selección A o B.

3. Método para la generación de una línea celular productora madre que comprende las etapas de

I) integrar de manera estable un casete de expresión en el genoma de una célula huésped o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':

- 5
- i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
  - ii) un promotor;
  - iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);
  - iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
- 10
- v) un fragmento de marcador de selección no funcional Ib que permite la formación de un marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario la presente en el casete NOI;

15

II) seleccionar una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (I) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de I);

III) integrar de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':

- 20
- i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
  - ii) un promotor;
  - iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección B que es diferente del marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);
  - iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
- 25
- v) un fragmento de marcador de selección no funcional IIb que permite la formación de un marcador de selección funcional II cuando se combina con el fragmento complementario IIa presente en el casete de expresión env que puede ser igual o puede ser diferente al fragmento de marcador de selección Ib;

30

en el que las secuencias que permiten la integración específica de sitio pueden ser idénticas o pueden ser diferentes a dichas secuencias del casete de expresión de I);

IV) seleccionar una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (III) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de (III);

35

V) integrar de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que contiene un promotor operativamente unido a una secuencia que codifica para gag/pol;

40

VI) seleccionar una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (V) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de V;

y en el que no se determina el orden de la integración de los diferentes casetes de expresión según (I), (III) y (V).

4. Método para la generación de una línea celular productora madre que comprende las etapas de:

45

I) integrar de manera estable un casete de expresión en el genoma de una célula huésped o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que comprende desde el extremo 5' hasta el extremo 3':

- i) una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
  - ii) un promotor;
  - iii) una secuencia que codifica para un marcador de selección A, dicha secuencia está operativamente unida con el promotor de ii);
- 50

- iv) una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
- v) un fragmento de marcador de selección no funcional Ib que permite la formación de un marcador de selección funcional I cuando se combina con el fragmento complementario la presente en el casete NOI;
- 5 II) seleccionar una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (I) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de I);
- 10 III) integrar de manera estable un casete de expresión env en el genoma de dicha célula o línea celular, dicho casete de expresión env comprende un constructo de nucleótidos que comprende:
- i) opcionalmente una primera secuencia que permite la integración específica de sitio;
- ii) un promotor;
- iii) secuencia(s) de gen(es) env operativamente unida(s) al promotor de ii);
- 15 iv) opcionalmente una segunda secuencia que permite la integración específica de sitio, dicha secuencia es diferente de la primera secuencia de i);
- vi) opcionalmente un fragmento de marcador de selección no funcional IIb que permite la formación de un marcador de selección funcional II cuando se combinan con el fragmento complementario IIa presente en el casete de expresión env que
- puede igual o puede ser diferente al fragmento de marcador de selección Ib;
- 20 en el que las secuencias que permiten la integración específica de sitio pueden ser idénticas o pueden ser diferentes a dichas secuencias del casete de expresión de I);
- (IV) seleccionar una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (III) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de (III);
- 25 (V) integrar de manera estable un casete de expresión diferente en el genoma de la célula o línea celular, dicho casete de expresión comprende un constructo de nucleótidos que contiene un promotor operativamente unido a una secuencia que codifica para gag/pol;
- (VI) seleccionar una línea celular transducida en la que el casete de expresión de (V) está integrado de manera estable en el genoma del huésped dando como resultado una línea celular transducida etiquetada con el casete de expresión de V);
- 30 y en el que el no se determina el orden de la integración de los diferentes casetes de expresión según (I), (III) y (V).
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los casetes de expresión de (I) y/o (III) contienen adicionalmente una LTR en 5' y en 3'.
- 35 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la introducción del/de los constructo(s) de nucleótidos se realiza mediante transfección o una infección.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6, en el que la integración de los casetes se efectúa mediante un sistema de recombinasa y/o mediante enzimas de restricción.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, en el que el sistema de recombinasa son los sitios de reconocimiento recombinasa Cre/loxP del bacteriófago P1 o la recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae*.
9. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el sistema de recombinación para la integración específica de sitio es el sistema FLP que usa diferentes variantes de dianas de reconocimiento de FLP (FRT) en el que las secuencias que flanquean el casete NOI y el casete env en ambos sitios y que permiten la recombinación específica de sitio son secuencias que no interactúan siendo diferentes entre sí.
- 45 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 9, en el que el fragmento de marcador de selección no funcional presente en el casete NOI y/o el casete env contiene un promotor o un elemento IRES operativamente unido a una secuencia de codón de iniciación que permite la expresión de un marcador de selección diferente al marcador de selección A o B cuando se complementa con el fragmento de marcador de selección no funcional complementario.

11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 10, en el que el fragmento de marcador de selección no funcional presente en el casete NOI y/o el casete env contiene sólo un promotor que activa un marcador de selección silencioso pero funcional integrado tras la etapa de etiquetado.
- 5 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 11, en el que el fragmento de marcador de selección no funcional presente en el casete NOI y/o el casete env contienen una señal de corte y empalme que permite la traducción del marcador de selección.
13. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el NOI codifica para una molécula seleccionada del grupo que consiste en proteínas, péptidos, secuencias de ácido nucleico antisentido, ribozimas y ARNip.
14. Método según la reivindicación 1, 2 ó 13, en el que el NOI es una molécula terapéuticamente útil.
- 10 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 a 14, en el que los marcadores de selección A y/o B se seleccionan del grupo que consiste en marcadores de resistencia a antibióticos, de resistencia a fármacos, de expresión celular y extracelular.
16. Método según la reivindicación 15, en el que los marcadores de selección A y/o B se seleccionan del grupo que consiste en GFP,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina secretada y marcadores de superficie celular.
- 15 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 16, en el que el promotor al que el NOI y/o el gen env está operativamente unido según a.) i) o b.) i) es una LTR ubicada en el sentido de 5' del NOI y/o el gen env, respectivamente.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos un casete contiene un promotor adicional operativamente unido a las secuencias que van a transcribirse.
- 20 19. Método según la reivindicación 18, en el que el promotor adicional se selecciona del grupo que consiste en promotores constitutivos y promotores para la expresión controlada o restringida en el tiempo.
20. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 19, en el que se introduce la recombinasa en la célula de empaquetamiento mediante transfección o infección.
- 25 21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 19, en el que se introduce la recombinasa en el sistema proporcionando directamente la enzima a las células.
22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 19, en el que el gen que codifica para la recombinasa está integrado de manera estable en el genoma del huésped operativamente unido con un promotor inducible.
23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el virus está pseudotipado.
- 30 24. Línea celular que produce virus que puede obtenerse con un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, y 5 a 23.
25. Línea celular productora madre que puede obtenerse con un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 22.
- 35 26. Uso de la línea celular que produce virus según la reivindicación 24 o la línea celular productora madre según la reivindicación 25 para la producción de virus.
27. Uso según la reivindicación 26 para la producción de una preparación terapéutica que contiene un virus o una partícula de virus para terapia génica.

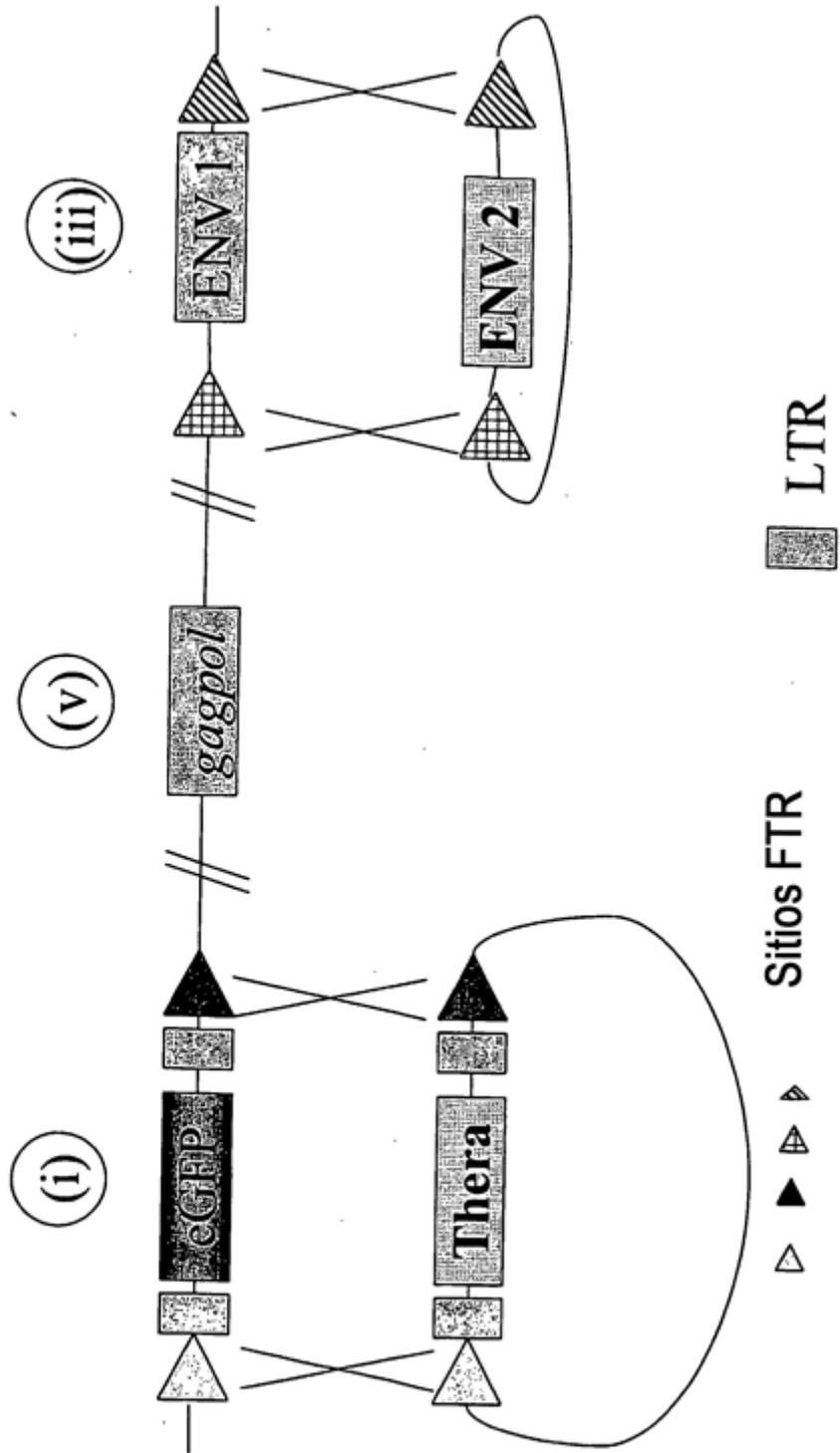


Fig. 1

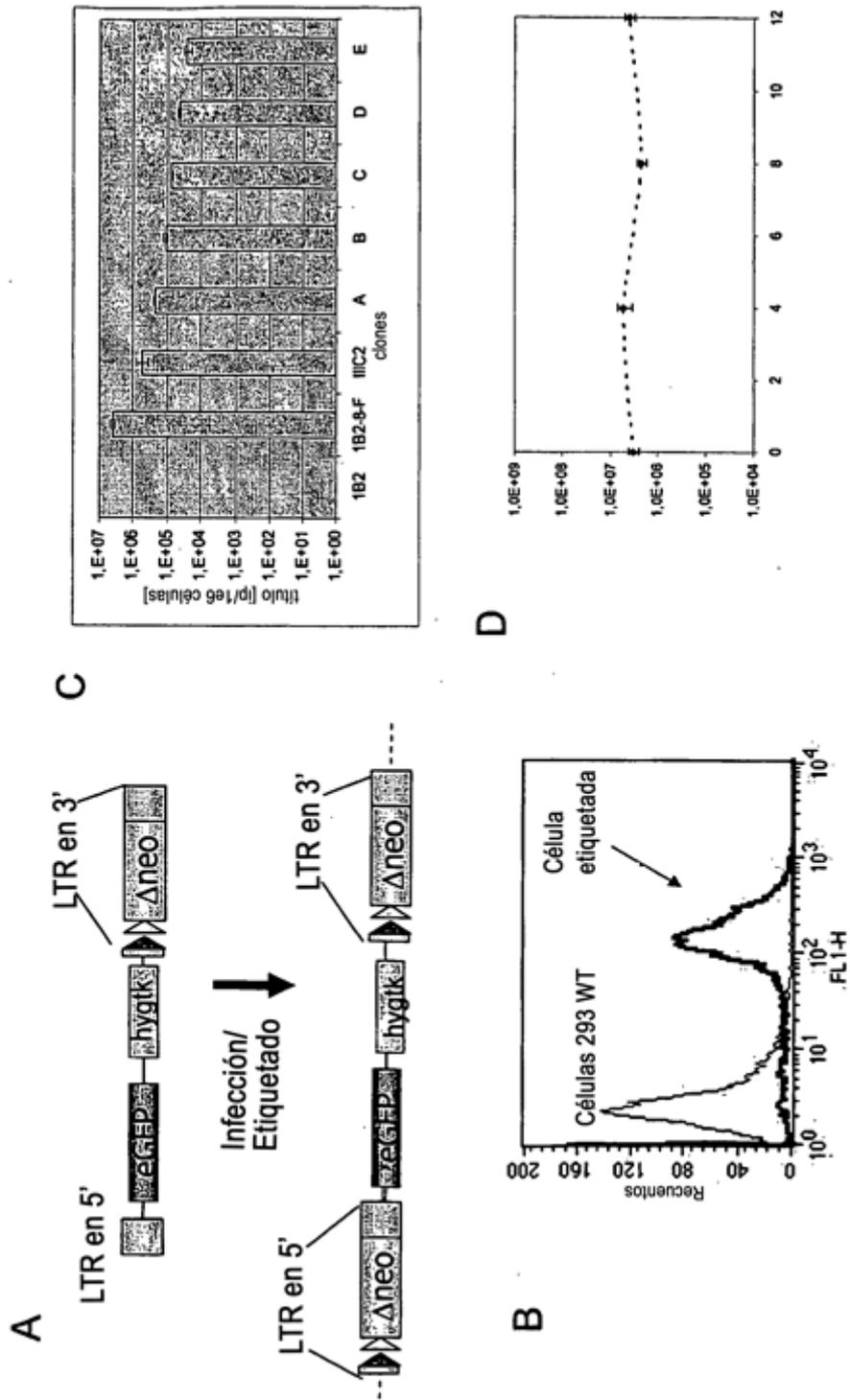


Fig. 2

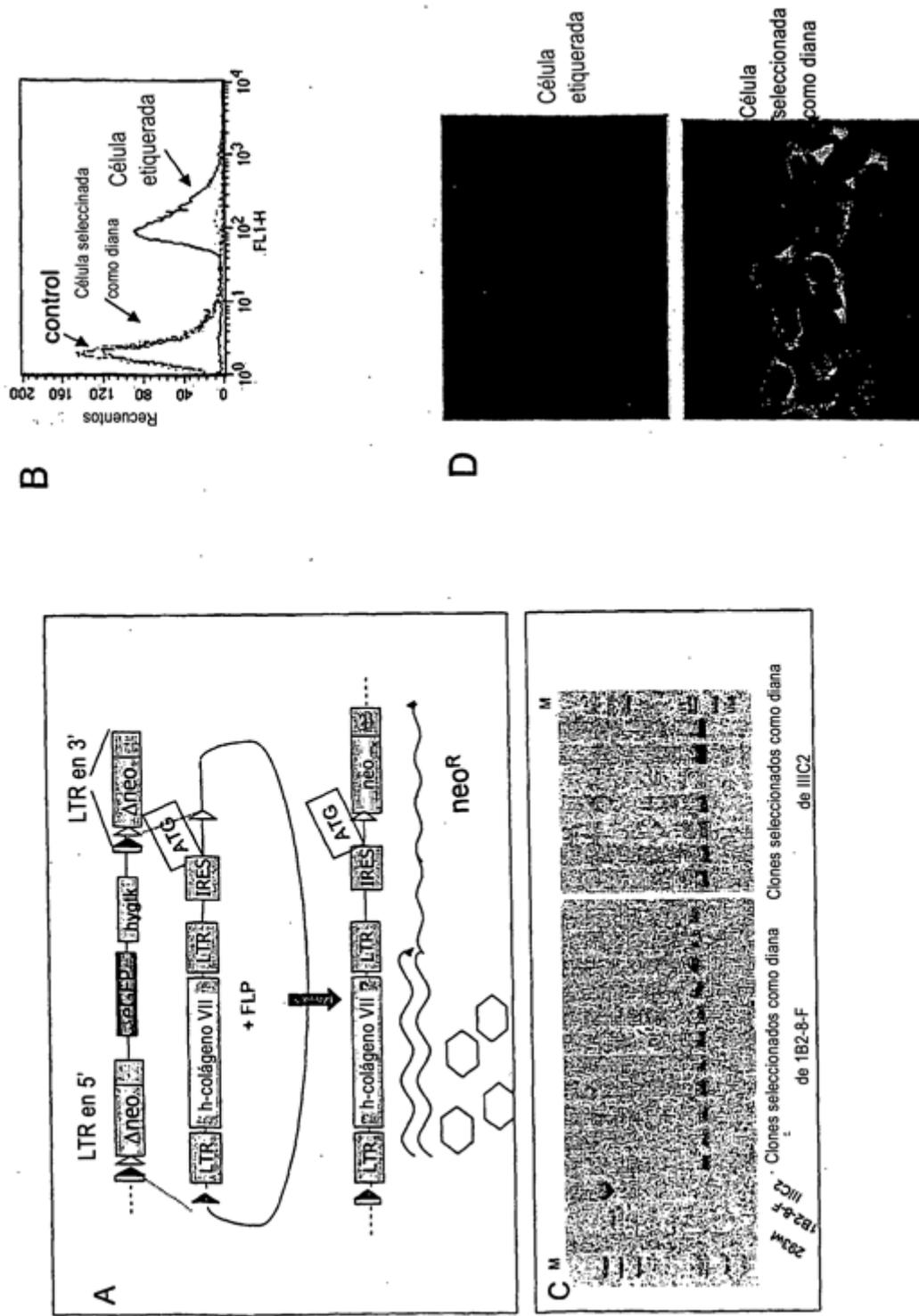


Fig. 3

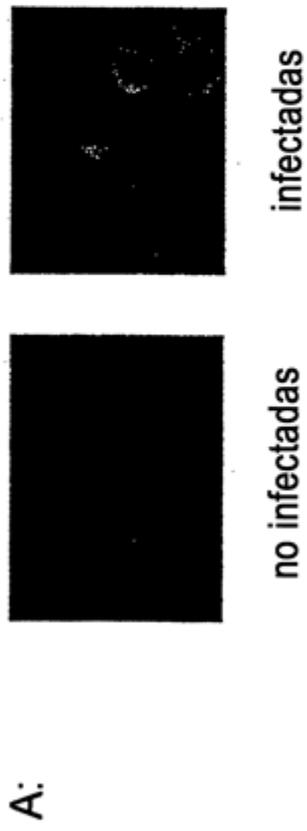
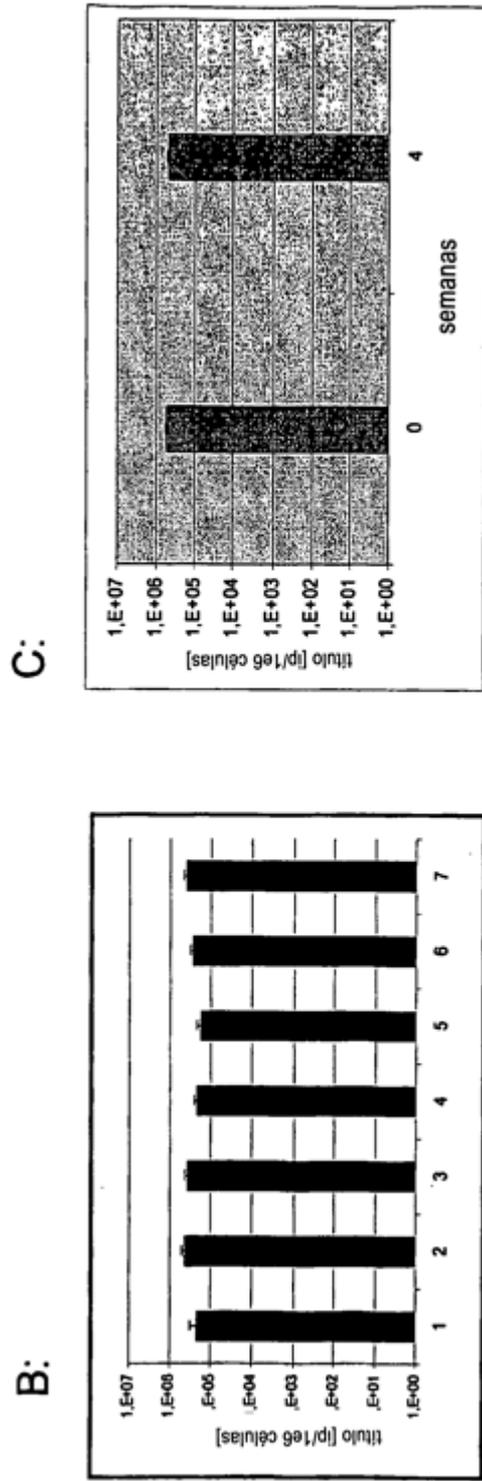


Fig. 4



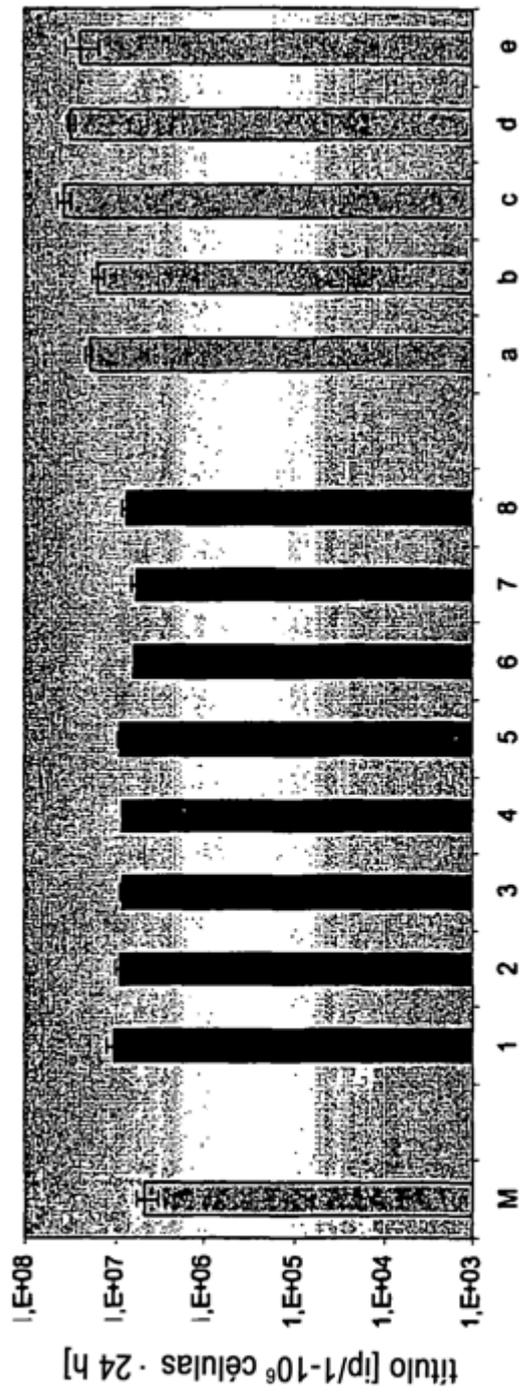


Fig. 5