



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 227**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06824268 .4**

96 Fecha de presentación : **17.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1954811**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54 Título: **Sistemas de expresión inducibles.**

30 Prioridad: **17.11.2005 EP 05077623**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73 Titular/es: **TET SYSTEMS GmbH & Co. KG.**
IM Neuenheimer Feld 582
69120 Heidelberg, DE

72 Inventor/es: **Berkhout, Benjamin y**
Das, Atze Taede

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 366 227 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

Sistemas de expresión inducibles

La invención se relaciona con la biología molecular, en particular se refiere a sistemas de expresión mejorados de ácidos nucleicos.

5 Sistemas para modular la expresión de ácido nucleico son importantes para una amplia variedad de áreas de investigación biológica básica y aplicada, que incluyen genómica funcional, terapia de genes, vacunación, modelos animales para enfermedades humanas y producción biofarmacéutica de proteína. En estas aplicaciones la expresión de un ácido(s) nucleico(s) de interés se controla preferiblemente de una manera cuantitativa y temporal. En la actualidad se encuentran disponibles varios sistemas de expresión genéticos artificiales que se regulan por moléculas efectoras no tóxicas de una manera dependiente de la dosis y reversible. El sistema Tet en el cual la expresión génica se controla rigurosamente por tetraciclina (Tc) o sus derivados doxiciclina (dox), es el circuito regulatorio más ampliamente usado (Baron et al. 2000; Gossen et al. 2001; Berens et al. 2003). Este sistema se basa en el enlace específico de secuencia, de alta afinidad, de la proteína represora Tet de *Escherichia coli* (TetR) con la secuencia de ADN de operador tet (tetO). Tc o dox se enlazan a TetR y provoca un cambio conformacional que previene que la proteína represora se enlace con tetO. La fusión del dominio de activación VP16 del virus herpes simplex al TetR dio lugar al activador transcripcional tTA, lo cual induce expresión de ácido nucleico de promotores (Ptet) que contienen tetO en células eucariotas (Gossen et al. 1992). La presencia de Tc o dox deroga la interacción tTA-tetO y desconecta la expresión génica (sistema Tet-off). Una variante tTA con cuatro sustituciones de amino ácido en la fracción TetR fue identificada, la cual exhibe un fenotipo reverso (Gossen et al. 1995). Este tTA reverso (llamado rtTA) se enlaza a Ptet exclusivamente en presencia de dox, pero no en su ausencia (sistema Tet-on). Ambos sistemas Tet son ampliamente aplicados ahora para controlar la expresión de ácido nucleico en eucariotas, que incluyen las de mamíferos, plantas e insectos (reseñado en Gossen et al. 2001)). WO 96/01313 describe una tetraciclina o sistema regulatorio inducible análogo usando rtTA que pueden usarse para regular expresión génica de un gen diana. El rtTA consiste de al menos dos polipéptidos de los cuales el primero se enlaza a las secuencias operadoras Tet y el segundo activa la transcripción en células eucariotas. Debido a que la exposición a largo plazo a los efectores es a menudo indeseable, el sistema Tet-on se prefiere en aplicaciones en los que la expresión de ácido nucleico ha de sustentarse en estado desconectado por períodos largos, o cuando se requiere inducción rápida de expresión de ácido nucleico.

Desafortunadamente, las sustituciones de amino ácido en rtTA que confieren el fenotipo reverso también afectan su afinidad de enlazamiento para efectores. Como consecuencia, rtTA ha perdido la habilidad de activarse por Tc y otros compuestos del tipo Tc, y requiere 100 veces más dox para inducción máxima de lo que se necesita para inhibición de tTA. Estas características limitan severamente el uso in vivo del sistema Tet-on. Por ejemplo, para activar expresión transgénica controlada en el cerebro de rata, los animales deben alimentarse con altas dosis de dox que es casi tóxico (Baron et al. 1997). Por lo tanto, el sistema Tet-on, particularmente su sensibilidad efectora, debe mejorarse.

Previamente el sistema Tet ha sido optimizado mediante la introducción de mutaciones diseñadas racionalmente (Baron et al. 1997; Baron et al. 1999), y por evolución directa en la que la mutagénesis aleatoria de los componentes del sistema Tet fue seguida por tamizaje (screening) funcional de los mutantes en sistemas de ensayo bacterianos o de levadura (Gossen et al. 1995; Urlinger et al. 2000). Sin embargo, estas propuestas involucran mucho trabajo y las mutaciones seleccionadas en sistemas de ensayo bacteriano o de levadura no son necesariamente mejoras en eucariotas superiores.

Otra desventaja de sistemas actuales rtTA es el riesgo de dependencia reducida de dox después de múltiples rondas de replicación. Este problema surge, por ejemplo, durante aplicaciones de vacunación donde la replicación de al menos parte de un patógeno está bajo control de un sistema rtTA. En tales aplicaciones de vacunación se adquiere protección contra dichos patógenos mediante replicación inducible, controlada, de dicha al menos parte de un patógeno, preferiblemente durante un lapso de tiempo moderado. Si, no obstante, el sistema rtTA pierde su dependencia dox, dicha al menos parte de un patógeno replicará de manera constitutiva, lo que resulta en demasiado ácido nucleico y/o proteínas, lo cual involucra un problema de seguridad. El mismo tipo de problema surge durante otras aplicaciones que involucran diversas rondas de amplificación de rtTA. Por lo tanto se desea mejorar la estabilidad genética de sistemas rtTA actuales.

Es un objeto de la presente invención suministrar rtTA y variantes de rtTA de cadena individual. Preferiblemente rtTA y variantes rtTA de cadena individual se suministran con al menos una propiedad mejorada.

La invención suministra un método para expresar de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés y el método comprende:

- suministrar una construcción de ácido nucleico que comprende dicha secuencia de ácido nucleico de interés enlazada de manera operativa a una expresión génica inducible que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual, dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual que comprende una mutación en un codón en la posición de aminoácido rTA;

- introducir dicha construcción de ácido nucleico a un sistema de expresión adecuado; y

- permitir expresión inducible de dicha secuencia de ácido nucleico de interés.

Según la presente invención, una mutación en el codón arriba mencionado de un ácido nucleico rTA o de un ácido nucleico de rTA de cadena individual (sc rTA) da lugar a un rTA o sc rTA mejorado si se compara con sistemas Tet-on usados en la actualidad, tales como se describen en (Gossen et al. 1995), (Urlinger et al. 2000) y (Krueger et al. 2003).

Usando un rTA o una variante de sc rTA de la presente invención, se suministra un rTA o sc rTA mejorado que tiene una actividad transcripcional, una sensibilidad dox superior, una estabilidad genética superior y/o un nivel más bajo de transcripción en ausencia de un inductor, tal como se compara con sistemas rTA o sc rTA usados en la actualidad. El nivel de transcripción en ausencia de un inductor se llama aquí actividad basal. Además, se proporcionan sistemas rTA y sc rTA que son inducibles mediante antibióticos diferentes de doxiciclina. Por lo tanto, el uso de un rTA y/o sc rTA de la presente invención se prefiere para expresar de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés.

Una modalidad preferida proporciona un método de acuerdo con la invención donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además una mutación en un codón en posición amino ácido rTA 12, y/o 86, y/o 209. Se ha mostrado que tales mutaciones adicionales dan lugar a características mejoradas de los sistemas rTA y sc rTA resultantes.

Un rTA (sc rTA) de cadena individual es un monómero que comprende las mismas propiedades trans-regulatorias que el dímero rTA en tipo, no necesariamente en cantidad. Dicho sc rTA comprende preferiblemente dos fracciones TetR y un dominio regulatorio eucariota. Dichas dos fracciones TetR se conectan preferiblemente unas a otras mediante un agente de enlace, dicho agente de enlace comprende preferiblemente una secuencia que codifica un agente de enlace (SG4)₅ que es suficientemente largo y flexible para permitir ensamble intramolecular de las dos proteínas TetR. Ejemplos no limitantes de trans-reguladores Tet de cadena individual se describen en (Krueger et al. 2003). Los métodos descritos aquí en la página 3050, último párrafo y página 3051 para generar un tTA de cadena individual y/o un rTA de cadena individual se incorporan aquí por referencia. Estos métodos son ejemplos no limitantes de la generación de sc rTA.

De acuerdo con la presente invención, una mutación en un sc rTA que corresponde a una mutación de acuerdo con la presente invención en un transregulador dimérico rTA da lugar a un rTA mejorado. Una mutación en un sc rTA corresponde a una mutación según la invención en un rTA dimérico cuando una mutación está presente en un codón que codifica un residuo de amino ácido en una posición dentro de dicho sc rTA que es comparable con la posición de aminoácido rTA.

Por expresión de manera inducible de una secuencia de ácido nucleico de interés se quiere decir aquí que la expresión de un ácido nucleico de interés se influencia en parte por al menos un inductor. Por lo tanto, regulando la cantidad de inductor que se administra a dicho sistema de expresión, uno es capaz de regular la cantidad de expresión de dicha secuencia de ácido nucleico de interés. Dicho inductor comprende preferiblemente un compuesto exógeno, lo que significa que dicho compuesto no se encuentra presente naturalmente dentro de dicho sistema de expresión. Preferiblemente, la expresión de una secuencia de ácido nucleico de interés es dependiente de la presencia de un inductor. Esto significa que dicho ácido nucleico se expresa en presencia de un inductor, mientras se expresa a una extinción significativamente menor en ausencia de dicho inductor. Preferiblemente dicha secuencia de ácido nucleico esencialmente no se expresa en ausencia de dicho inductor.

Una secuencia de ácido nucleico de interés se enlaza operativamente a un sistema de expresión de ácido nucleico inducible cuando dicho sistema inducible de expresión de ácido nucleico es capaz de expresar secuencia de ácido nucleico de interés. Preferiblemente dicha secuencia de ácido nucleico de interés está bajo control de un promotor que contiene tetO. Expresión de dicho ácido nucleico de interés se inhibe al menos en parte en ausencia de un inductor, puesto que rTA y/o sc rTA no activan expresión activada por tetO cuando está ausente un inductor. En presencia de un inductor, rTA y/o sc rTA son capaces de activar expresión activada por tetO de dicho ácido nucleico de interés.

Una secuencia de ácido nucleico rTA o sc rTA de acuerdo con la invención se define como una secuencia de ácido nucleico rTA o sc rTA derivada de una secuencia rTA o sc rTA (Urlinger et al. 2000; Das et al. 2004; Krueger et al.

2003), dicha secuencia rTA o sc rTA ha sido provista con al menos una mutación de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente al menos una mutación de acuerdo con la invención se introduce a la secuencia rTA representada en la figura 19. Un método de acuerdo con la invención se suministra preferiblemente, por lo tanto, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende al menos una mutación o combinación de mutaciones de acuerdo con la invención comparada con una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA representada en la figura 19.

Un ácido nucleico rTA y/o un ácido nucleico sc rTA es provisto con una mutación de la presente invención en una variedad de formas. Por ejemplo, es posible introducir artificialmente al menos una mutación de acuerdo con la presente invención en un ácido nucleico rTA o sc rTA, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida lateralmente. Se conocen en el estado de la técnica diversos métodos para introducir artificialmente una mutación específica y no requieren mayor explicación aquí. Una vez se introduce una mutación o una combinación de mutaciones de acuerdo con la invención, preferiblemente se sigue amplificando un ácido nucleico rTA o sc rTA de la invención. Así, de manera adjunta también se proporcionan rTA o sc rTA amplificados que comprenden una mutación de acuerdo con la invención. Es claro que ya no es necesario introducir artificialmente una mutación de acuerdo con la invención una vez está disponible una secuencia de ácido nucleico rTA o sc rTA de la invención, puesto que durante la amplificación se mantiene una mutación de la invención.

También es posible seleccionar un rTA y/o sc rTA con al menos una mutación de acuerdo con la invención a partir de una colección de ácidos nucleicos rTA/sc rTA. Por ejemplo, mutaciones no específicas se introducen a una colección de ácidos nucleicos rTA/sc rTA, y se selecciona una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una mutación de acuerdo con la invención (opcionalmente después de amplificación). En una modalidad preferida el ácido nucleico rTA o sc rTA de la invención se selecciona de una colección de rTA o sc rTA amplificado mediante un método de evolución y de selección. Puesto que una mutación de la invención proporciona al menos una ventaja a un ácido nucleico rTA /sc rTA, es posible seleccionar un ácido nucleico con una mutación de la invención sobre la base de tal ventaja. Por ejemplo, una mutación de la invención que da lugar a sensibilidad aumentada para dox se selecciona usando cantidades muy pequeñas de dox. Un sistema de expresión génica inducible se incuba con una cantidad muy pequeña de dox, y se seleccionan sistemas sensibles. Como otro ejemplo, se selecciona una mutación de la invención que da lugar a una actividad basal disminuida seleccionando un sistema inducible de expresión de ácido nucleico con muy baja actividad, si tiene alguna, en ausencia de un inductor.

En una modalidad, se usa evolución forzada para generar y seleccionar un ácido nucleico rTA y/o sc rTA con al menos una mutación de acuerdo con la invención. En tal método se realiza amplificación de rTA o sc rTA con un método que involucra la introducción de desajustes. Esto se realiza preferiblemente usando un genoma de un virus que comprende ARN porque la naturaleza propensa a error de su maquinaria de replicación (por ejemplo, la enzima transcriptasa reversa (RT) o enzima polimerasa ARN) permite la generación de secuencias de ácido nucleico modificadas. De esta manera se producen moléculas de ácido nucleico alteradas rTA/sc rTA. Si tal secuencia alterada de ácido nucleico comprende una mutación de acuerdo con la invención, dicho ácido nucleico tendrá una ventaja sobre las secuencias de ácido nucleico sin una mutación de la invención. Como resultado, moléculas de ácido nucleico que comprenden al menos una mutación de acuerdo con la invención sobrepasarán en crecimiento las moléculas de ácido nucleico sin una mutación de la invención. Como resultado se selecciona fácilmente un ácido nucleico rTA y/o sc rTA que comprende al menos una mutación de acuerdo con la invención.

En una modalidad preferida se usa un método de evolución forzada con ayuda de un genoma de virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1); dicho método de evolución forzada se describe en WO 01/20013, página 21, líneas 5-28.

Como se usa aquí, una variante rTA o sc rTA se representa por el término "X[número]Y", donde X representa el tipo de residuo de amino ácido presente en un activador rTA usado actualmente, [número] representa la posición de dicho residuo de amino ácido en dicho rTA, e Y representa el residuo de amino ácido que está presente actualmente en dicha posición en dicha variante. Por ejemplo, V9I significa una variante que comprende un residuo de isoleucina en posición 9 de amino ácido rTA en lugar de un residuo de valina. Las variantes que comprenden múltiples mutaciones se representan mediante múltiples indicaciones X[número]Y. Por lo tanto, la variante V9I F67S R171K F86Y significa una variante que comprende una isoleucina en posición 9 de amino ácido rTA en lugar de valina y que comprende una serina en posición 67 de amino ácido rTA en lugar de una fenilalanina y que comprende una lisina en posición 171 de amino ácido rTA en lugar de una arginina y que comprende una tirosina en posición 86 de amino ácido rTA en lugar de una fenilalanina.

Qué mutación de acuerdo con la invención, o qué combinación de mutaciones de acuerdo con la invención, se usa en una aplicación específica depende por ejemplo del tipo de ventaja(s) que se desea. Por ejemplo, para expresión transgénica in vivo inducible en un cerebro, se desea particularmente un ácido nucleico rTA y/o sc rTA sensible, puesto que sólo una pequeña cantidad de inductor es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica. Para tal aplicación, se prefiere un ácido nucleico rTA / sc rTA con una mutación de acuerdo con la invención que da lugar a al menos una sensibilidad mejorada. En tal caso, la variante V9I F67S G138D F86Y, V9I F67S G138D F86Y A209T,

V9I F67S E157K F86Y, V9I F67S E157K F86Y A209T, V9I F67S R171K F86Y, V9I F67S R171K F86Y A209T, E37Q F67S F86Y, E37Q F67S F86Y A209T, V9I G19M F67S G138D F86Y, V9I G19M F67S G138D F86YA209T, V9I S12G F67S G138D F86Y, V9I S12G F67S G138D F86Y A209T, V9I F67S C68R G138D F86Y y/o V9I F67S C68R G138D F86Y A209T se prefiere porque estas variantes tienen sensibilidad a doxiciclina de más de 100 veces al compararse con rTA, sin actividad basal, o muy poca, en ausencia de inductor (tal como se indica en la figura 14B). Si no es problema cierto nivel de actividad basal en ausencia de inductor, se prefiere particularmente una variante V9I G19M F67S G138D F86Y y/o V9I G19M F67S G138D F86Y A209T rTA que es más de 300 veces más sensible para inducción de doxiciclina al compararse con rTA (indicada en Figura 14).

Además, una variante rTA o sc rTA que comprende además un residuo de alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina o tirosina en la posición 19 de amino ácido rTA tiene una actividad de transcripción mejorada al compararse con el rTA conocido en la actualidad. Dichas variantes tienen una actividad de transcripción mejorada a una baja concentración de doxiciclina (entre 10 y 100 ng/ml) y/o una actividad de transcripción incrementada a una alta concentración de doxiciclina (entre 100 y 1000 ng/ml) al compararse con rTA conocido en la actualidad. Una modalidad de la invención proporciona, por lo tanto, una secuencia de amino ácido aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia rTA y/o una secuencia sc rTA; dicha secuencia rTA y/o secuencia sc rTA comprende alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina o tirosina en posición 19 de amino ácido rTA. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia que codifica una secuencia rTA y/o una secuencia sc rTA; dicha secuencia rTA y/o secuencia sc rTA que comprende alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina o tirosina en posición 19 de amino ácido rTA también se proporciona adjuntamente, como también un uso de dicha secuencia de ácido nucleico en un método según la invención para expresar de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés.

Una variante rTA o sc rTA que comprende además un residuo de cisteína, metionina, glutamina, arginina o treonina en posición 37 de amino ácido rTA tiene una actividad mejorada de transcripción en comparación con rTA conocido actualmente. Dichas variantes tienen una actividad incrementada de transcripción a una baja concentración de doxiciclina (entre 10 y 100 ng/ml) y/o una actividad incrementada de transcripción a una concentración alta de doxiciclina (entre 100 y 1000 ng/ml) en comparación con rTA conocido actualmente. Una modalidad de la invención proporciona, por lo tanto, una secuencia de amino ácido aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia rTA y/o una secuencia sc rTA, y dicha secuencia rTA y/o secuencia sc rTA comprende un residuo de cisteína, metionina, glutamina, arginina o treonina en posición 37 de amino ácido rTA. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que comprende una secuencia que codifica una secuencia rTA y/o una secuencia sc rTA; también se proporciona adjunto una secuencia rTA y/o secuencia sc rTA que comprende un residuo de cisteína, metionina, glutamina, arginina o treonina en posición 37 de amino ácido rTA, así como un uso de dicha secuencia de ácido nucleico en un método de acuerdo con la invención para expresar de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés.

Si se usa un ácido nucleico rTA y/o sc rTA de la invención para propósitos de vacunación que involucran expresión controlada de una secuencia de ácido nucleico de interés (derivada de patógeno), es importante que la actividad basal sea mínima. Es indeseada la expresión de un ácido nucleico patogénico de interés en ausencia de un inductor porque daría lugar a la presencia continua de dicho ácido nucleico patogénico de interés. En ese caso, un organismo sería desafiado demasiado con ácido nucleico patogénico, lo cual podría dar lugar, por ejemplo, a enfermedad y/o tolerancia del sistema inmune para dicho ácido nucleico patogénico de interés. Si se induce tolerancia se disminuye protección contra un desafío posterior con dicho patógeno. Evitar actividad basal, al menos en parte, es particularmente importante si se controla de manera inducible la replicación de un patógeno viable mediante un sistema rTA y/o sc rTA. La replicación continua de dicho patógeno involucra el riesgo de dispersar y hacer crecer mucho demasiados organismos patógenos, lo que da lugar a enfermedad. Para propósitos de vacunación, se prefiere, por lo tanto, una variante rTA y/o sc rTA de la invención con una actividad basal muy baja – si tiene alguna. En tal caso, la variante F67S F86Y, F67S F86Y A209T, F67S G138D F86Y, F67S G138D F86Y A209T, F67S E157K F86Y, F67S E157K F86Y A209T, F67S R171K F86Y, F67S R171K F86Y A209T, V9I F67S R171K F86Y, V9I F67S R171K F86Y A209T, S12G F67S F86Y, S12G F67S F86Y A209T, G19M F67S F86Y y/o G19M F67S F86Y A209T se usa preferiblemente. Estas variantes tienen una actividad basal muy baja de 0.1 por ciento o menos. Una variante V9I F67S R171K F86Y y/o V9I F67S R171K F86Y A209T rTA variant se usa de la manera más preferible. Estas variantes tienen una actividad basal muy baja y son muy sensibles puesto que tienen una sensibilidad de doxiciclina de más de 100 veces en comparación con rTA (indicada en la figura 14).

La invención proporciona además variantes de rTA y sc rTA con especificidades alteradas de inductor. Se proporcionan variantes rTA y sc rTA que son inducibles por antibióticos distintos de doxiciclina. Por lo tanto, aunque otros compuestos como dox, tales como tetraciclina (Tc) y minociclina (Mc) no activan efectivamente el tipo silvestre de rTA, la invención proporciona variantes que se han vuelto inducibles por al menos uno de estos antibióticos. Esto proporciona entre otras cosas la ventaja de que la tetraciclina sea adecuada como inductor, la cual es más barata

que la doxiciclina. Además, las variantes rTA y sc rTA de acuerdo con la invención que son inducibles por antibióticos distintos de la doxiciclina son adecuadas para el desarrollo de variantes rTA y/o sc rTA con una especificidad alterada que son inducibles por al menos un antibiótico distinto de la doxiciclina pero por la doxiciclina misma. La figura 15 muestra variantes preferidas de acuerdo con la invención que son sensibles a tetraciclina y/o minociclina, excepto por el tipo silvestre rTA y el mutante F86Y A209T.

La invención proporciona, por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual; dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende una mutación o una combinación de mutaciones como se representa en la figura 15 excepto por la mutación F86Y A209T (y, por supuesto, excepto por la variante de tipo silvestre). Un uso de al menos una de dichas secuencias de ácidos nucleicos para expresión inducible con tetraciclina y/o expresión inducible con minociclina de una secuencia de ácido nucleico de interés también se proporciona adjuntamente.

Preferiblemente se usa mutante F67S V9I G138D F86Y A209T, G19M F67S V9I G138D F86Y A209T, S12G F67S V9I G138D F86Y A209T y/o C68R F67S V9I G138D F86Y A209T para expresión inducible con tetraciclina de una secuencia de ácido nucleico de interés ya que estos mutantes son particularmente sensible para tetraciclina, lo que significa que una pequeña cantidad de tetraciclina es suficiente para inducir expresión génica. De la manera más preferible, se usa mutante F67S V9I G138D F86Y A209T, y/o S12G F67S V9I G138D F86Y A209T para expresión inducible con tetraciclina de una secuencia de ácido nucleico de interés ya que estos mutantes son muy sensibles para tetraciclina y muestran baja actividad de fondo en ausencia de cualquier efector.

En una modalidad más, se usa mutante F67S V9I G138D F86Y A209T, F67S V9I E157K F86Y A209T, F67S V9I R171K F86Y A209T, F67S E37Q F86Y A209T, G19M F67S V9I G138D F86Y A209T, S12G F67S V9I G138D F86Y A209T y/o C68R F67S V9I G138D F86Y A209T para expresión inducible con minociclina de una secuencia de ácido nucleico de interés puesto que estos mutantes son particularmente sensibles para minociclina, lo que significa que una pequeña cantidad de minociclina es suficiente para inducir expresión génica. De la manera más preferible, se usa mutante F67S V9I G138D F86Y A209T, F67S E37Q F86Y A209T, y/o S12G F67S V9I G138D F86Y A209T para expresión inducible con minociclina de una secuencia de ácido nucleico de interés puesto que estos mutantes son muy sensibles para minociclina y muestran muy baja actividad de fondo en ausencia de cualquier efector.

La invención proporciona además variantes rTA y sc rTA que son genéticamente estables. Sistemas Tet-on usados de manera inducible están en riesgo de convertirse en un sistema que expresa de manera constitutiva una secuencia de ácido nucleico de interés. Esto se evita preferiblemente, por ejemplo (entre otras cosas), cuando se controla la replicación de un patógeno mediante un sistema Tet-on. La replicación constitutiva de dicho patógeno daría lugar a la presencia de demasiados patógenos que involucra el riesgo de enfermedad y/o tolerancia.

En una modalidad más preferida, se usa un ácido nucleico rTA o sc rTA que comprende además un codón de alanina, cisteína, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina en la posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato. Un ácido nucleico de acuerdo con esta modalidad no es sólo genéticamente estable, sino – excepto por la variante G19W – también es más sensible para doxiciclina. Una modalidad por lo tanto proporciona un método de acuerdo con la invención donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual que comprende un codón de alanina, cisteína, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato. Codones adecuados en posición 19 de amino ácido rTA que difieren en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato son codón UUN (N corresponde a G, A, U, o C (codificación para fenilalanina o leucina), UCN (serina), UAY (Y corresponde a U o C; tirosina), UGU (cisteína), UGC (cisteína), UGG (triptofano), CUN (leucina), CAY (histidina), CGN (arginina), AUN (isoleucina o metionina), ACN (treonina), AAY (asparagina), AGN (serina o arginina), GUY (valina) y GCI (alanina).

En otra modalidad preferida, se proporciona un método de acuerdo con la invención donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual que comprende un codón de cisteína, fenilalanina, isoleucina, leucina, arginina, serina o treonina en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en tres nucleótidos de un codón de glutamato. Tal variante es en particular genéticamente estable porque se requerirían tres mutaciones para generar una variante G19E. Codones adecuados en posición 19 de amino ácido rTA que difieren en al menos tres nucleótidos de un codón de glutamato son codón UUY (Y corresponde a U o C; que codifican fenilalanina), UCI (serina), UGY (cisteína), CUY (leucina), CGY (arginina), AUY (isoleucina), ACI (treonina) y AGY (serina).

También se proporciona un ácido nucleico de rTA o sc rTA que comprende además un codón en posición 37 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina y de serina. Si se usa tal variante es menos probable que ocurra mutación espontánea E37K, E37A y E37S en comparación con rTA/sc rTA

usado en la actualidad porque esto requeriría una mutación más difícil de dos impactos. Como consecuencia, se impide, al menos en parte, pérdida de dependencia de inductor. Por lo tanto, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende un codón en posición 37 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina. Codones adecuados en posición 37 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina son codón CUN (que codifica leucina, N representa U, C, A o G), CAU, CAC (ambos CAU y CAC que codifican para histidina), CGA y CGG (ambos CGA y CGG que codifican para arginina). Por lo tanto, se proporciona preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual que comprende codón CUN, CAU, CAC, CGA o CGG en posición 37 de amino ácido rTA.

Una modalidad preferida proporciona un método de acuerdo con la invención dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato y un codón en posición 37 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina. Tal variante es genéticamente estable de manera particular puesto que se previenen al menos en parte mutaciones espontáneas G19E, E37K, E37A y E37S.

Un ácido nucleico rTA y/o sc rTA que comprende además un codón alterado en posición 56 de amino ácido rTA también proporciona estabilidad aumentada. Se ha encontrado que en ausencia de doxiciclina, las variantes rTA están en riesgo de evolucionar a variantes que tienen un residuo de amino ácido alterado en posición 56 de amino ácido rTA y que ya no son dependientes de doxiciclina. La invención proporciona, por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico aislada, recombinante o sintético que comprende secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o sc rTA que comprende un codón en la posición 56 de amino ácido rTA que difiere en al menos un nucleótido, preferiblemente una transversión, de un codón que actúa de mediador en la actividad de transcripción en ausencia de un inductor. La mayoría de dichas variantes de rTA independientes de doxiciclina contienen o bien un residuo de serina, tirosina, cisteína, histidina, asparagina, alanina o bien residuo de glicina en posición 56 en lugar de una prolina. Para evitar, al menos en parte, el desarrollo de tal variante, se proporciona preferiblemente un ácido nucleico que codifica rTA y/o sc rTA, el cual comprende una glutamina que codifica codón CAA o CAG o una lisina que codifica codón AAA o AAG en posición 56 de amino ácido rTA.

Aquí una transversión se define como una sustitución de una purina en una pirimidina, o una sustitución de una pirimidina en una purina. Es menos probable que ocurra una transversión durante la evolución natural en comparación con una sustitución de una purina en otra purina, o una sustitución de una pirimidina en otra pirimidina. Por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o sc rTA que comprende un codón en posición 56 de amino ácido rTA que difiere en al menos una transversión de un codón que codifica un residuo de serina, tirosina, cisteína, histidina, asparagina, alanina o glicina es genéticamente más estable en comparación con rTA y sc rTA actual.

De acuerdo con la presente invención, un ácido nucleico rTA o sc rTA con al menos un codón mutado en posición de amino ácido rTA comprende al menos una característica mejorada en comparación con sistemas Tet-on disponibles en la actualidad. Preferiblemente, un método de acuerdo con la invención se proporciona donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón en posición 9 de amino ácido rTA que codifica isoleucina, y/o un codón en posición 19 de amino ácido rTA que codifica alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina, y/o un codón en posición 37 de amino ácido rTA que codifica treonina, histidina, leucina, arginina, cisteína, metionina o glutamina, y/o un codón en posición 56 de amino ácido rTA que codifica lisina o glutamina, y/o un codón en posición 67 de amino ácido rTA que codifica serina, y/o un codón en posición 68 de amino ácido rTA que codifica arginina, y/o un codón en posición 86 de amino ácido rTA que codifica tirosina, y/o un codón en posición 138 de amino ácido rTA que codifica aspartato o serina, y/o un codón en posición 157 de amino ácido rTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 171 de amino ácido rTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 177 de amino ácido rTA que codifica leucina, y/o un codón en posición 195 de amino ácido rTA que codifica serina, y/o un codón en posición 209 de amino ácido rTA que codifica treonina. Cualquiera de estas mutaciones o cualquier combinación de estas, se prefiere puesto que mejoran particularmente al menos una propiedad de un sistema de expresión inducible de ácido nucleico.

Para mejorar rTA y/o sc rTA, es suficiente introducir una mutación de acuerdo con la invención a una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o sc rTA. Sin embargo, preferiblemente se introducen al menos dos mutaciones de acuerdo con la invención, puesto que una combinación de al menos dos mutaciones de acuerdo con la invención mejora más al menos una propiedad de rTA y/o sc rTA. En una modalidad más preferida un ácido nucleico rTA y/o un ácido nucleico sc rTA comprende al menos tres mutaciones de acuerdo con la presente invención. De la manera más preferible, un ácido nucleico rTA y/o un ácido nucleico sc rTA comprende al menos cuatro mutaciones de acuerdo con la presente invención.

En la figura 14 se representan diversas variantes preferidas de rTA y/o sc rTA de acuerdo con la presente invención. Estas variantes se prefieren particularmente para usar en un sistema de expresión génica inducible. Por lo tanto, la invención proporciona además un método de acuerdo con la invención donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende al menos una variante como se representa en la figura 14. En una modalidad preferida una secuencia de ácido nucleico de interés se expresa de manera inducible por variante rTA V9I G19M F67S G138D F86Y y/o por variante V9I G19M F67S G138D F86Y A209T. Estas variantes son cerca de 385 veces más sensibles para doxiciclina en comparación con rTA usado actualmente. De aquí que estas variantes sean particularmente adecuadas para aplicaciones donde están disponibles y/o son deseadas pequeñas cantidades de inductor (por ejemplo durante expresión transgénica en un cerebro). En otra modalidad preferida se expresa de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés por variante de rTA V9I F67S R171K F86Y y/o por variante V9I F67S R171K F86Y A209T. Estas variantes son cerca de 100 veces más sensibles por doxiciclina en comparación con rTA usado en la actualidad, mientras que al mismo tiempo la actividad basal es muy baja (cerca de 0.1 por ciento). Por lo tanto, estas variantes son particularmente adecuadas para aplicaciones donde se desea sensibilidad por doxiciclina, mientras que la actividad basal es indeseable (por ejemplo, durante la expresión inducible de un patógeno).

Una mutación de acuerdo con la presente invención es adecuada además para mejorar al menos una característica de moléculas derivadas de rTA y/o TetR alternativas, además de rTA y sc rTA. Tal molécula derivada de rTA y/o TetR alternativa comprende, por ejemplo, un dominio de activación alternativa de transcripción (véase, por ejemplo [Akagi et al. 2001] y [Kemper et al. 2002]), o un silenciador de transcripción en el que el dominio de activación se ha reemplazado por un dominio represor de transcripción (tTS, véase por ejemplo [Deuschle et al. 1995]), o el activador de transcripción tTA, el cual es activo en ausencia de un efector y se reprime por un efector (Gossen y Bujard, 1992).

Cualquier sistema de expresión inducible de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico rTA y/o sc rTA de acuerdo con la presente invención y/o una molécula alternativa derivada de la misma es adecuado para expresar de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés. Son posibles aplicaciones in vivo y también ex vivo. En una modalidad se usa un sistema de expresión de ácido nucleico procarionota. Preferiblemente dicho ácido nucleico de interés se expresa en un sistema de expresión eucariota, porque una secuencia de rTA y/o secuencia de sc rTA que comprende un dominio de activación VP16 de virus herpes simplex es particularmente adecuada para regular la expresión de ácido nucleico de promotores que contienen tetO en células eucariotas. Una secuencia de ácido nucleico rTA y/o sc rTA de acuerdo con la presente invención, y moléculas alternativas derivadas de la misma, son adecuadas para usar en un sistema de expresión eucariota inferior. Además, una secuencia de ácido nucleico rTA y/o sc rTA de acuerdo con la presente invención y moléculas alternativas derivadas de la misma son adecuadas para usar en un sistema de expresión eucariota superior. En una modalidad dicho ácido nucleico de interés y/o una molécula alternativa derivada del mismo se expresa en una célula de mamífero.

Por principio, cualquier secuencia de ácido nucleico de interés se expresa de manera inducible por un sistema de expresión de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, aplicaciones adecuadas para un sistema de expresión inducible de acuerdo con la presente invención son la producción de fármacos de proteína, expresión in vivo de proteínas terapéuticas y producción de animales transgénicos donde un gen (patógeno) de interés se expresa de manera inducible, por nombrar sólo algunos. En una modalidad, al menos una secuencia viral esencial para replicación de un virus o replicón se expresa de manera inducible por un sistema de expresión de ácido nucleico expresión de la invención. Esto es particularmente adecuado para propósitos de vacunación para suministrar al menos protección parcial a un patógeno viral, donde es importante que dicho virus o replicón replique para obtener una respuesta inmune eficaz, pero donde también es importante que dicha replicación no vaya más allá del nivel requerido para dicha respuesta inmune. Un replicón se define como una molécula de ácido nucleico capaz de replicación en un medio adecuado, tal como una célula permisiva, porque tiene todos los elementos necesarios para replicación en un medio así. Lo llamamos replicón porque no se derivará siempre directamente de las secuencias de nucleótido del patógeno original.

Colocando al menos una secuencia viral esencial para replicación de un virus o replicón bajo control de una secuencia de ácido nucleico rTA y/o sc rTA de la invención, dicho virus o replicón replica de una manera controlada. La cantidad de replicación necesaria para provocar una buena respuesta inmune, sin replicación alguna más allá de aquel nivel, se regula de este modo regulando la cantidad de inductor que se administra a un sistema de expresión inducible de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Para prevenir fuga, se prefiere tener una combinación de genes esenciales bajo tal control y se prefiere aún más tener al menos dos combinaciones diferentes represor/activador en control de al menos uno, pero preferiblemente mpas de un gen esencial para replicación. En la mayoría de patógenos (virales) un número de genes es esencial para replicación, pero la mayoría de ellos también tienen una suerte de "interruptor maestro", usualmente en un gen temprano, usualmente transactivando otros genes. Un primer candidato a poner bajo control directo de un represor/activador es tal interruptor maestro, por supuesto, lo cual proporciona luego de manera indirecta control sobre otros genes

esenciales para replicación. Aún se prefiere incluso poner al menos otro gen esencial bajo control de un represor/activador inducible.

En una modalidad al menos parte de un genoma de VIH esencial para replicación se expresa de manera inducible bajo control de una secuencia de ácido nucleico rTA y/o sc rTA de la invención. Esto es adecuado, por ejemplo, para profilaxis mejorada de SIDA en comparación con métodos conocidos en la actualidad. En esta modalidad no se requiere un interruptor maestro puesto que un genoma de VIH está bajo control de una unidad individual de transcripción.

Una secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico rTA y/o una secuencia de ácido nucleico sc rTA, dicha secuencia de ácido nucleico rTA y/o secuencia de ácido nucleico sc rTA que comprende al menos una mutación de acuerdo con la presente invención, encuentra utilidad en una variedad amplia de aplicaciones. Dicha secuencia de ácido nucleico es particularmente adecuada para usar en un sistema inducible de expresión de ácido nucleico. La invención proporciona así una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual, dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende a un codón mutado en posición 67 de amino ácido rTA. En una modalidad dicha secuencia de ácido nucleico comprende además un codón mutado en posición 12 y/o 86, y/o 209 de amino ácido rTA. Una secuencia de ácido nucleico que comprende tal combinación de mutaciones también se mejora en comparación con rTA conocido en la actualidad.

En una modalidad preferida una secuencia de ácido nucleico de la invención con una estabilidad genética mejorada comparada con sistemas Tet-on usados actualmente. Esto es particularmente deseado en aplicaciones que involucran múltiples rondas de amplificación de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, por ejemplo durante replicación controlada de un patógeno viral o replicón. Como se explica arriba, la estabilidad genética se mejora diseñando una secuencia de ácido nucleico rTA y/o sc rTA con un codón en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato, con un codón en posición 37 de rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina, y/o con un codón en posición 56 de rTA que codifica lisina o glutamina. Además se proporciona, por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende un codón en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato, un codón en posición 37 de rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina, y/o un codón en posición 56 de rTA que codifica lisina o glutamina. En una modalidad dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende un codón de glicina en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato, de modo que el residuo de amino ácido resultante del activador rTA o sc rTA en posición 19 de rTA es el mismo que el activador codificado por ácido nucleico rTA y sc rTA usados en la actualidad.

Preferiblemente se usa un ácido nucleico rTA or sc rTA que comprende un codón de alanina, cisteína, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato. Un ácido nucleico de acuerdo con esta modalidad es no solo genéticamente estable al compararse con sistemas Tet-on usados en la actualidad, sino, excepto para la variante G19W, también es más sensible para doxiciclina. Una modalidad preferida proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende un codón de leucina, de histidina o de arginina en posición 37 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina.

Una modalidad preferida más proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón en posición 56 de amino ácido rTA que difiere en al menos un nucleótido, preferiblemente una transversión, de un codón que actúa como mediador en la actividad de transcripción en ausencia de inductor. Dicho codón en posición 56 de amino ácido rTA preferiblemente codifica un residuo de glutamina o de lisina.

Más preferiblemente se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención que comprende además un codón de acuerdo con la invención en al menos dos posiciones de amino ácido rTA que se seleccionan del grupo que consiste de las posiciones 19, 37 y 56. Por lo tanto, preferiblemente se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención que comprende un codón en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato y un codón en posición 37 de rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina. Además se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención que comprende un codón en posición 19 de amino ácido rTA que difiere

en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato y un codón en posición 56 de rTA que codifica lisina o glutamina. Además se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención que comprende un codón en posición 37 de rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina y un codón en posición 56 de rTA que codifica lisina o glutamina.

- 5 Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención de la manera más preferible comprende además un codón de acuerdo con la invención en posición 19, 37 y 56 de amino ácido rTA. Una modalidad preferida proporciona, por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención que comprende un codón en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato, un codón en posición 37 de rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina, y un codón en posición 56 de rTA que codifica lisina o glutamina.

- 15 Como se enuncia arriba, una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención preferiblemente comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica sc rTA, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende un codón en posición 9 de amino ácido rTA que codifica isoleucina, y/o un codón en posición 19 de amino ácido rTA que codifica alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina, y/o un codón en posición 37 de amino ácido rTA que codifica treonina, histidina, leucina, arginina, cisteína, metionina o glutamina, y/o un codón en posición 56 de amino ácido rTA que codifica lisina o glutamina, y/o un codón en posición 67 de amino ácido rTA que codifica serina, y/o un codón en posición 68 de amino ácido rTA que codifica arginina, y/o un codón en posición 86 de amino ácido rTA que codifica tirosina, y/o un codón en posición 138 de amino ácido rTA que codifica aspartato o serina, y/o un codón en posición 157 de amino ácido rTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 171 de amino ácido rTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 177 de amino ácido rTA que codifica leucina, y/o un codón en posición 195 de rTA amino ácido que codifica serina, y/o un codón en posición 209 de amino ácido rTA que codifica treonina. Estas mutaciones se prefieren puesto que cada una de ellas mejora particularmente al menos una propiedad de un sistema inducible de expresión de ácido nucleico. Por lo tanto, o bien una de estas mutaciones, o bien cualquier combinación de las mismas, esté presente preferiblemente en una secuencia de ácido nucleico de la invención.

- 20 También se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante de acuerdo con la invención, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende al menos una variante como se representa en la figura 14.

- 25 Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención preferiblemente comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual que comprende al menos una mutación en comparación con una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA or sc rTA publicada en (Gossen et al. 1995), (Urlinger et al. 2000) y (Krueger et al. 2003) y/o representada en la figura 19.

- 35 La invención proporciona además una secuencia de amino ácido aislada, sintética o recombinante, codificada por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Dicha secuencia de amino ácido preferiblemente comprende además una secuencia de rTA y/o una secuencia rTA de cadena individual, dicha secuencia rTA y/o secuencia rTA de cadena individual comprende una isoleucina en posición 9, y/o una alanina, cisteína, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionine, asparagina, arginina, serina, treonina, valina, aspartato, glutamina, triptofano o tirosina en posición 19, y/o una treonina, histidina, leucina, arginina, cisteína, metionina o glutamina en posición 37, y/o una lisina o glutamina en posición 56, y/o una serina en posición 67, y/o una arginina en posición 68, y/o una tirosina en posición 86, y/o un aspartato o serina en posición 138, y/o una lisina en posición 157, y/o una lisina en posición 171, y/o una leucina en posición 177, y/o una serina en posición 195, y/o una treonina en posición 209. Cada una de estas mutaciones particularmente confiere al menos una propiedad mejorada a un activador de rTA y/o sc rTA.

- 40 Tal como se explicó arriba, una secuencia de ácido nucleico de la invención y/o una secuencia de amino ácido codificada por una secuencia de ácido nucleico de la invención es particularmente adecuada para expresar de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés. Por lo tanto, también se proporciona de manera adjunta el uso de una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante y/o secuencia de amino ácido de acuerdo con la invención para la expresión inducible de una secuencia de ácido nucleico de interés.

Dicha secuencia de amino ácido comprende preferiblemente al menos una de las mutaciones mencionadas arriba.

- 45 Además se proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Tal vector es adecuado para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, un vector de la invención que comprende una secuencia de ácido nucleico beneficiosa terapéuticamente es adecuado para aplicaciones terapéuticas. Una administración de tal vector a un individuo en necesidad de la misma da lugar a una expresión de dicha secuencia de ácido nucleico terapéutica in vivo. Por supuesto, dicho vector también encuentra utilidad en aplicaciones que

involucran expresión in vitro de una secuencia de ácido nucleico de interés. En el estado de la técnica son bien conocidos métodos para construir un vector con una secuencia particular de ácido nucleico. Ejemplos no limitantes de vectores adecuados para generar un vector de la invención son vectores retrovirales y lentivirales.

5 También se proporcionan adjuntamente un replicón inducible viral, que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención y al menos una secuencia viral que es esencial para replicación bajo control directo o indirecto de dicha secuencia de ácido nucleico. Como se explicó antes, un replicón se define como una molécula de ácido nucleico capaz de replicación en un medio adecuado, tal como una célula permisiva, porque tiene todos los elementos necesarios para replicación en un medio así. Lo llamamos un replicón porque no siempre se derivará directamente de las secuencias nucleótidas del patógeno original, por ejemplo en el caso de virus de ADN monocatenario (de una sola hebra), virus de ARN, etc. Tipicamente, para manipular formas bicatenarias (de dos hebras) de ácido nucleico, son necesarias formas de ADN bicatenario de manera típica. Por lo tanto, replicones preferidos serán ácidos nucleicos de ADN bicatenario en al menos una etapa de su ciclo de vida.

15 Un replicón también está destinado a reflejar que el patógeno real, o su pariente vacuna viva atenuada, usualmente comprende más que solo ácido nucleico. El ácido nucleico se empaqueta de manera típica en una partícula (viral). Por lo tanto, un replicón de acuerdo con la invención preferiblemente también codifica una señal funcional de empaque, lo que permite que el ácido nucleico en su forma tipo silvestre (ARN en el caso de un retrovirus, etc.) se empaque en una partícula viral. Para que el replicón sea capaz de replicar en un huésped se prefiere que dicho replicón también lleve los genes estructurales para las proteínas de la envoltura y/o cápsida, esté en formato de tipo silvestre o en un formato un tanto diferente (enlazamiento diana reducido o aumentado, etc.). Para promover la independencia de inductor de un replicón viral de acuerdo con la invención y/o para prevenir al menos en parte la pérdida de dependencia de inductor, un replicón viral inducible de acuerdo con la invención preferiblemente comprende todas las secuencias virales que son esenciales para replicación bajo control directo o indirecto de dicha secuencia de ácido nucleico.

25 Un replicón viral de la invención se deriva preferiblemente de cualquier virus que comprende una etapa donde, al menos parte de su genoma, está presente en la forma de ADN, de tal manera que la maquinaria Tet-on sea capaz de regular la expresión de un ácido nucleico de interés. Tales virus, por ejemplo, comprenden virus y retrovirus de ADN. En una modalidad, al menos parte de dichas secuencias virales en dicho replicón inducible es ARN.

30 En una modalidad preferida, un replicón de acuerdo con la invención se deriva de un virus de inmunodeficiencia humana. Ahora, un replicón de acuerdo con la invención se ejemplifica más allá mediante las modalidades preferidas que se relacionan con un replicón derivado de HIV. Sin embargo, la invención también es aplicable a replicones derivados de otros patógenos.

35 Típicamente, un replicón de la invención derivado de HIV sería un clon de ADN bicatenario (de doble hebra) infeccioso de una cepa de VIH. Preferiblemente dicha cepa de VIH ya es una cepa atenuada, o se ha hecho una cepa atenuada introduciendo mutaciones, tales como deleciones funcionales, por ejemplo, aquellas descritas aquí. Cualesquiera elementos represor/activador que son inducibles son aplicables por principio en la presente invención. En el caso de controles inducibles dobles o más, la fuga de un represor/activador individual se vuelve menos importante, aunque se sigue prefiriendo mucho que no haya esencialmente fuga. Como una válvula de seguridad, sería ventajoso proveer al replicón con un gen suicida que puede activarse cuando ocurren efectos indeseados tales como una replicación más allá de lo que se requiere para una respuesta inmune o rescate por parte de un virus tipo silvestre, etc. Un gen suicida así es, por ejemplo, HSV-tk, que puede inducirse adicionado ganciclovir o un equivalente funcional del mismo. Al inducirse, dicho gen suicida matará la célula infectada y así inhibirá más replicación e infección de otras células. Así, en otra modalidad preferida adicional, la invención proporciona un replicón de acuerdo con la invención que comprende además un gen suicida.

45 Para atenuar un replicón de HIV y/o el virus resultante se prefiere proveer al replicón con una deleción funcional del elemento TAR. Así, en otra modalidad preferida adicionalmente, la invención proporciona un replicón de acuerdo con la invención, que además comprende un elemento TAR desactivado.

50 Para atenuar un replicón de HIV de acuerdo con la invención se prefiere deletar (suprimir) funcionalmente el elemento Tat. De esta manera, la invención también proporciona un replicón de acuerdo con la invención, que además comprende un elemento Tat desactivado. Preferiblemente, ambos elementos mencionados arriba se suprimen funcionalmente. Una deleción funcional significa que al menos su función en la replicación del replicón se inhibe al menos parcialmente. Típicamente, genes esenciales para replicación no deben ser completamente disfuncionales.

55 Las proteínas necesarias para retirar elementos de represión o de inicio de activación que están presentes corriente arriba de los genes esenciales a ponerse bajo control, se codifican preferiblemente por un replicón de acuerdo con la invención y se insertan preferiblemente en un gen no esencial. Así, la invención también proporciona en una modalidad preferida un replicón de acuerdo con la invención donde al menos una parte funcional de dicho represor

y/o activador inducibles, preferiblemente una secuencia de ácido nucleico rTA y/o sc rTA de acuerdo con la presente invención, se inserta en un gen nef. La parte funcional en este caso se refiere, por supuesto, a cualquier sustancia de proteína capaz de activar el elemento en control del gen esencial. Preferiblemente se crea espacio para la secuencia que codifica dicha sustancia de proteína. De esta manera, la invención también proporciona un replicón de acuerdo con la invención en el que al menos parte del gen nef se suprime para crear espacio para la inserción.

Para seguir atenuando un replicón de acuerdo con la invención más elementos del virus de tipo silvestre pueden ser suprimidos funcionalmente. De esta manera, la invención proporciona además un replicón de acuerdo con la invención, en el que al menos se ha suprimido un elemento NF-kB. Se prefiere que el motivo a activarse sea un motivo tetO, preferiblemente presente en un LTR. Así, la invención también proporciona un replicón de acuerdo con la invención, que comprende al menos un motivo tetO en al menos un LTR funcional.

Se prefiere tener más de un elemento antes de un gen esencial. De esta manera, la invención también proporciona un replicón que comprende al menos 2, 4, 6, u 8 elementos así en al menos un LTR funcional.

Al menos un LTR se modifica preferiblemente para evitar, al menos en parte la reversión al virus de tipo silvestre.

La invención proporciona además métodos que usan los replicones para producir virus dependientes, es decir virus que necesitan un agente inductor para poder replicar. Así, la invención proporciona un método para producir un virus dependiente de un agente inductor para replicación, que comprende proporcionar una célula permisiva con un replicón de acuerdo con la invención, cultivar dicha célula en la presencia de dicho agente inductor y cosechar dicho virus dependiente a partir de dicho cultivo. Una vez más, tales métodos se aplican preferiblemente a VIH. Así, la invención proporciona un método en el que dicho virus dependiente es un virus de inmunodeficiencia humana, preferiblemente un virus atenuado.

En una modalidad, el agente inductor es doxiciclina o un análogo funcional de la misma. En otra modalidad, sin embargo, dicho agente inductor comprende un antibiótico distinto de doxiciclina, preferiblemente tetraciclina y/o minociclina. Como se enunció antes, si se desea dependencia de tetraciclina y/o minociclina, se prefiere un replicón de acuerdo con la invención el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o sc rTA que comprende

Una mutación o una combinación de mutaciones como se representa en la figura 15, excepto por el rTA de tipo silvestre y la variante F86Y A209T.

Más preferiblemente, un replicón de acuerdo con la invención que comprende mutaciones F67S V9I G138D F86Y A209T, G19M F67S V9I G138D F86Y A209T, S12G F67S V9I G138D F86Y A209T y/o C68R F67S V9I G138D F86Y A209T se usa para expresión inducible de tetraciclina de una secuencia de ácido nucleico de interés puesto que estos replicones son particularmente sensibles para tetraciclina, lo que significa que una pequeña cantidad de tetraciclina es suficiente para inducir expresión génica. De la manera más preferible, un replicón de acuerdo con la invención que comprende mutación F67S V9I G138D F86Y A209T, y/o S12G F67S V9I G138D F86Y A209T se usa para expresión inducible por tetraciclina de una secuencia de ácido nucleico de interés puesto que éstos replicones son muy sensibles para tetraciclina y muestran baja actividad de fondo en la ausencia de efector.

En una modalidad preferida más, un replicón de acuerdo con la invención que comprende mutaciones, F67S V9I G138D F86Y A209T, F67S V9I E157K F86Y A209T, F67S V9I R171K F86Y A209T, F67S E37Q F86Y A209T, G19M F67S V9I G138D F86Y A209T, y/o S12G F67S V9I G138D F86Y A209T se usa para expresión inducible por minociclina de una secuencia de ácido nucleico de interés puesto que estos replicones son particularmente sensibles para minociclina, lo que significa que una pequeña cantidad de minociclina es suficiente para inducir expresión génica. De la manera más preferible, un replicón de acuerdo con la invención que comprende mutaciones F67S V9I G138D F86Y A209T, F67S E37Q F86Y A209T, y/o S12G F67S V9I G138D F86Y A209T se usa para expresión inducible por minociclina de una secuencia de ácido nucleico de interés puesto que estos replicones son muy sensibles para minociclina y muestran baja actividad de fondo en la ausencia de efector.

También parte de la presente invención son virus producidos por dichos métodos o que pueden producirse por dichos métodos. De esta manera, la invención también proporciona un virus dependiente de un agente inductor para replicación que puede obtenerse mediante un método de acuerdo con la invención, preferiblemente de nuevo un virus de inmunodeficiencia humana, de nuevo preferiblemente atenuado. En el estado de la técnica se conocen métodos para producir un replicón y/o virus de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, ejemplos no limitantes de métodos para producir un replicón viral inducible a partir de VIH, que comprende una secuencia de elementos rTA y TetO, y usos de los mismos, se describen en WO01/20013 página 9, renglón 13 a página 18 renglón 27.

Un replicón y/o virus de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para inmunización y vacunación. La administración de un replicón y/o virus de acuerdo con la invención a un individuo permite la replicación controlada

- de dicho replicón y/o virus dentro de dicho individuo, lo que da lugar a una respuesta inmune en dicho individuo. El alcance de la replicación de dicho replicón o virus y, como resultado, el alcance de la respuesta inmune obtenida se controla regulando la presencia y/o la cantidad de inductor. En una modalidad se obtiene una respuesta inmune en un individuo para proveer a dicho individuo con protección al menos parcial contra infección por el tipo de virus a partir del cual se deriva dicho replicón o virus de la invención. En otra modalidad se obtiene una respuesta inmune en un animal no humano para producir un compuesto de enlace (tal como, por ejemplo, anticuerpos y/o células T) y/o una célula capaz de producir tal compuesto de enlace (tal como una célula B). Dichos anticuerpos, células T y/o células B, o una parte funcional y/o un ácido nucleico de los mismos, se cosechan preferiblemente para otro uso, por ejemplo para la producción de anticuerpos monoclonales.
- 5
- 10 Por supuesto, en el estado de la técnica se conocen diversos métodos y aplicaciones alternativos que involucran inmunización y/o vacunación. El uso de un replicón y/o virus de acuerdo con la invención en tales métodos y aplicaciones también está dentro del alcance de la presente invención.
- La invención proporciona de esta manera una composición inmunogénica que comprende un replicón de acuerdo con la invención y/o un virus de acuerdo con la invención. Una composición inmunogénica que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención también se proporciona. Una composición inmunogénica de la invención preferiblemente comprende un adyuvante y/o soporte adecuado. Adyuvantes y soportes son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, se usa un adyuvante de sal de aluminio y/o una solución salina.
- 15
- En una modalidad dicha composición inmunogénica comprende además una cantidad de agente inductor. Sin embargo, esto no es necesario: un agente inductor puede administrarse en cualquier momento. En una modalidad preferida, dicha composición inmunogénica comprende una vacuna capaz de provocar protección total contra el tipo de virus del cual se deriva dicho replicón o virus de acuerdo con la invención. Esto significa que la subsiguiente infección con el tipo de virus del cual se deriva dicho replicón o virus de acuerdo con la invención no da lugar esencialmente a enfermedad.
- 20
- Una composición inmunogénica o una vacuna puede comprender una unidad individual de de dosificación, pero también puede comprender al menos un agente inductor por separado, o puede hacerse en el sitio a partir de un replicón y/o virus que se reconstituyen con un excipiente líquido tal como suero salino, opcionalmente junto con un adyuvante y/o un agente inductor. En el campo se conocen bien las vacunas virales. Las reglas generales prácticas aplicables a vacunas conocidas también aplicarán a composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención. Se hallarán las dosis a través de los estudios de dosis normales realizados durante ensayos (pre)clínicos, por ejemplo mediante titulación simple de la cantidad de doxiciclina como agente inductor. Una composición inmunogénica p vacuna puede ser suficiente por sí misma, pero también puede usarse en adición a otros compuestos terapéuticos y/o profilácticos. El agente inductor puede necesitarse por un período más largo de tiempo y puede proporcionarse por separado.
- 25
- 30
- Una vez más, una composición inmunogénica y/o vacuna preferida de la invención es una para la profilaxis al menos parcial de infección con un virus de inmunodeficiencia humana.
- 35
- La invención también proporciona un uso de dicha composición inmunogénica y/o vacuna en que proporciona un método para profilaxis y/o tratamiento al menos parcial de SIDA, que comprende administrar una composición inmunogénica y/o vacuna según la invención a un individuo y permitir replicación viral por un tiempo limitado proporcionando dicho agente inductor. Son posibles vacunaciones de refuerzo, preferiblemente mediante re-adición simple del dicho agente inductor en tiempos posteriores.
- 40
- La invención también proporciona un método para la replicación controlada de un virus o un replicón viral que comprende proporcionar una célula permisiva con un replicón o un virus de acuerdo con la invención, cultivar dicha célula en la presencia de dicho agente de inducción y manipular la cantidad de agente de inducción presente.
- 45
- Tal como se explica arriba, un replicón, un virus y/o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención son adecuados para provocar una respuesta inmune contra un virus de interés. Dicha respuesta inmune es capaz de prevenir, al menos en parte una infección posterior, replicación y/o propagación por dicho virus de interés. Además, una respuesta inmune de un individuo que ya sufre de una infección por dicho virus de interés aumenta por un replicón, virus y/o secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, lo que da lugar a una mejor neutralización de la enfermedad.
- 50
- De esta manera, replicones, virus y secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención son adecuados para usar como un medicamento y/o vacuna. Por lo tanto, un replicón o virus de acuerdo con la presente invención para usar como un medicamento y/o vacuna se proporcionan de manera adjunta, así como una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante de acuerdo con la invención para usar como un medicamento y/o vacuna. Es posible colocar al menos una secuencia esencial de HIV para replicación bajo control directo o indirecto de un ácido nucleico rTA y/o sc rTA de la presente invención. De esta forma ha sido posible la replicación controlada de HIV
- 55

permitiendo profilaxis y/o tratamiento al menos parcial de SIDA. Por lo tanto, también se proporciona de manera adjunto un uso de un replicón aislado o recombinante, un virus y/o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento o composición inmunogénica para prevenir y/o tratar, al menos en parte, SIDA.

- 5 Otra modalidad proporciona una célula aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico, un replicón y/o un virus de acuerdo con la invención.

La invención se explica además en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que sirven simplemente para clarificar la invención.

EJEMPLOS

10 EJEMPLO 1

Hemos reportado previamente sobre la construcción de un virus HIV-rtTA infeccioso que depende críticamente de dox para replicación (Verhoef et al. 2001; Das et al. 2004b; Marzio et al. 2001). En este virus, el activador natural de transcripción Tat y su sitio de enlace TAR se inactivaron mediante mutación y se reemplazaron funcionalmente por los componentes del sistema Tet-on (Fig. 1A). El gen que codifica el activador de transcripción rtTA se insertó en el lugar del gen nef, y los sitios de enlace de ADN tetO se introdujeron en el promotor viral LTR. Este virus no replica en la ausencia de dox. Al administrar dox, rtTA active la transcripción del promotor LTR-tetO, da lugar a una expresión de las proteínas virales y replicación viral. A continuación se ha suministrado una variante que ha adquirido dos cambios de amino ácido en la proteína rtTA: la fenilalanina en posición 86 se reemplazó por tirosina (F86Y) y la alanina en posición 209 por treonina (A209T) (Das et al. 2004a).

- 20 Iniciamos múltiples cultivos, independientes de virus de la variante HIV-rtTA_{F86YA209T}, que contiene tanto la configuración del promotor LTR-tetO optimizado como el gen de rtTA mejorado. Después de cultivar el virus con dox por hasta 200 días, el gen rtTA fue secuenciado. Las mutaciones F86Y y A209T se mantuvieron establemente en todos los cultivos analizados. Varios virus de cultivos independientes tuvieron mutaciones adicionales adquiridas en el gen de rtTA. Una variante de virus debe tener una ventaja de replicación para volverse la secuencia dominante en una población de virus. Mutaciones en rtTA pueden mejorar la función rtTA, y de esa manera promueven la replicación viral. Para aumentar la oportunidad de identificar tales mutaciones benéficas, nos enfocamos en mutaciones de rtTA que se observaron en múltiples cultivos (Fig. 1A y tabla 1). Todas estas sustituciones de amino ácido se localizan en su parte TetR de rtTA: V9I está en la hélice $\alpha 1$ dentro del dominio de enlace DNA, F67S está en el bucle que sigue a $\alpha 4$, y G138D, E157K, y R171K están dentro de la región $\alpha 8$ - $\alpha 9$ del dominio de núcleo regulatorio (Fig. 1B). V9I se encontró tanto como una mutación individual como en combinación con G138D, E157K, o R171K. También fue observada una combinación de F67S y R171K. Hay siete variantes naturales de TetR (A-E, G, H) y rtTA se basa en la clase B (TetR^B). De manera interesante, solo TetR^B tiene una Fe en posición 67, mientras que la mayoría de TetRs tienen una Ser en esta posición (Tabla 1). Otras sustituciones de amino ácido observadas en los rtTAs evolucionados no están nunca presentes en variantes de TetR.

35 **Caracterización de las variantes de rtTA evolucionadas.**

- Para ensayar si los rtTAs evolucionados exhiben actividad de transcripción mejorada, ensayamos actividad de rtTA en un sistema Tet regular. Los plásmidos de expresión que codifican el original (tipo Silvestre, esta es la variante rtTA^S-S2 descrita en Urlinger et al. 2000) y proteínas rtTA mutantes (V1-V10, Tabla 1) se construyeron y se transfectoron a células C33A con un plásmido que expresa reportero de luciferasa bajo el control del promotor LTR-2 Δ tetO viral. El nivel de luciferasa medido dos días después de la transfección refleja actividad de rtTA (Fig. 2A). rtTAs de tipo silvestre y todos los mutantes de rtTA no muestran actividad en la ausencia de dox. Actividad de rtTA de tipo silvestre es detectable primero a 500 ng/ml de dox e incrementa más a 1000 ng/ml. Actividad de rtTA V1 (F86Y A209T) ya es detectable a 50 ng/ml de dox e incrementa gradualmente con mayores concentraciones de dox. A 1000 ng/ml de dox, la variante V1 es 2.5 veces más activa que el tipo silvestre. Todos los mutantes evolucionaron desde rtTA V1, y su actividad debe compararse de esta manera con esta variante. rtTA V2 es más activa que V1 a su concentración más baja de dox que se haya ensayado, pero menos activa a niveles altos de dox. Los otros rtTAs con una sola sustitución de amino ácido (V3-V6) son más activos que V1, tanto a nivel bajo como alto de dox. Las variantes V7, V8, y V9 combinan la mutación V2 con la mutación V4, V5, y V6, respectivamente. Estas combinaciones mejoran además actividad de rtTA tanto a nivel alto como a nivel bajo. La variante V10, que combina las mutaciones V3 y V6, es el rtTA más activo de las variantes evolucionadas naturalmente. Por lo tanto, la evolución viral dio lugar a varias variantes novedosas de rtTA con actividad aumentada de transcripción y sensibilidad de dox comparada con rtTA de tipo silvestre y la variante V1 que se usó para iniciar el experimento de evolución.

- Para ensayar si esta optimización de rtTA refleja una adaptación específica al promotor LTR-2 Δ tetO viral, ensayamos actividad rtTA con un gen reportero en el cual la expresión de luciferasa bajo el control de un promotor CMV mínimo acoplado a un arreglo de siete elementos tetO [4]. Todas las variantes rtTA demuestran actividad

mejorada con esta construcción de promotor (Fig. 2B), el cual imita el resultado con la construcción de LTR-2ΔtetO (Fig. 2A). De esta manera, las mutaciones observadas en rtTA no son adaptaciones específicas de virus, sino son mejoramientos generales del sistema Tet-on. También ensayamos actividad de rtTA en células HeLa X1/6 [9] que contienen copias integradas de manera cromosómicamente de la construcción de reportero de luciferasa CMV-7tetO (Fig. 2C). En estas células, el rtTA evolucionado muestra un patrón similar de actividad como con construcciones génicas de reportero episomal en células C33A. Así, estas mutaciones mejoran la actividad rtTA independiente del tipo de promotor y el estatus episomal o cromosómico del gen diana.

Para comparar la sensibilidad dox de las variantes de rtTA de otra manera, calculamos la concentración dox que cada variante de rtTA necesita para lograr una actividad similar a la rtTA del tipo silvestre a 1000 ng/ml de dox (Fig. 3). La variante V10 necesita solo 44 ng/ml de dox para lograr este nivel de actividad, que refleja una sensibilidad dox 23 veces superior al rtTA del tipo silvestre. Esto hace que la variante V10 sea la más sensible a dox y el rtTA más activo (6.6 veces más activo que el tipo silvestre, Fig. 3) de las variantes evolucionadas naturalmente.

Combinación de las mutaciones benéficas mejora más la actividad rtTA.

El análisis de las variantes rtTA evolucionadas reveló que los mutantes dobles exhiben una actividad superior y mayor sensibilidad dox que los mutantes individuales. Por ejemplo, V6 (R171K) es 4.4 veces más sensible que el rtTA de tipo silvestre, y el mutante doble V9 (V9I R171K) es 14.9 veces más dox-sensible. Por lo tanto, construimos variantes adicionales de rtTA en los que las mutaciones observadas se combinaron (V11-V18, Tabla 1), y se ensayó su actividad (Fig. 2D). Tal como se muestra en la Fig. 3, todas las variantes de combinación demuestran una actividad de transcripción superior y una sensibilidad dox mayor que las variantes evolucionadas naturalmente. Los mutantes triples V14, V15, y V16 son los rtTAs más activos y más dox-sensibles. Cuando se comparan con rtTA de tipo silvestre, estos mutantes triples son 7 veces más activos a niveles altos de dox y 100 veces más sensibles a dox. Las variantes V15 y V16 no muestran actividad basal sin dox, mientras que nosotros observamos con frecuencia una actividad baja pero distintivamente basal con la variante V14 (menos de 0.1% del nivel inducido). Un listado más extenso de variantes de rtTA novedosas que tienen mutaciones observadas en la evolución de HIV-rtTA y que demuestran actividad de transcripción y dox-sensibilidad mejorada se muestra en la figura 14B.

Para excluir la posibilidad de que la actividad aumentada observada para los rtTAs mutantes resultara de un nivel incrementado de proteína, determinamos el nivel de estado continuo intracelular de las proteínas rtTA. Se sometieron lisados de células HeLa X1/6 transfectados con plásmidos de expresión rtTA a SDS-PAGE, seguido de análisis western blot con anticuerpos anti-TetR policlonales. Una cantidad igual de proteína rtTA fue detectada para todas las variantes evolucionadas naturalmente y construidas (Fig. 4, y los datos no se muestran). Estos resultados indican que la actividad aumentada y la sensibilidad dox son propiedades intrínsecas de las proteínas rtTA mutantes y no resultan de la expresión incrementada o estabilidad de proteína.

Variantes de rtTA novedosas pueden activarse mediante compuestos.

Dox es el efector más eficiente que control al sistema Tet-on. Otros compuestos del tipo dox, tales como tetraciclina (Tc) y minociclina (Mc), no activan efectivamente el rtTA del tipo silvestre y el virus HIV-rtTA original. Para verificar si las variantes rtTA novedosas con actividad mejorada y sensibilidad dox tienen una especificidad de efector más amplia, ensayamos actividad de un subconjunto de estas variantes de rtTA a diferentes concentraciones Tc y Mc (Fig. 6). Mientras que el rtTA de tipo silvestre y la variante V1 no se activan por Tc y Mc, el mutante V3 muestra un nivel bajo de actividad a una alta concentración de Tc o Mc (10000 ng/ml). Actividad de V7 ya es detectable a Tc o Mc de 1000 ng/ml, y esta actividad se incrementa a niveles superiores de efector. V14, que combina las mutaciones V3 y V7, muestra la actividad más alta con Tc y Mc. La actividad a Tc de 10000 ng/ml es similar a aquella del rtTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml. A Mc de 1000 ng/ml, V14 es incluso más activo que el rtTA del tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml. De esta manera hemos generado variantes de rtTA con una especificidad ampliada de efector. Un listado más extenso de variantes de rtTA novedosas que son sensibles a Tc y/o Mc se muestra en la figura 15.

Variantes rtTA mejoran replicación de HIV-rtTA.

Para verificar si las variantes de rtTA con actividad aumentada y sensibilidad dox también pueden mejorar replicación de HIV-rtTA, construimos variantes virales con los genes de rtTA que codifican mutantes V7 o V14, y ensayamos su replicación en células Supt1 en diferentes concentraciones de dox (Fig. 6). El HIV-rtTA_{V1} original (HIV-rtTA_{F86Y A209T}) se incluyó como un control. Este HIV-rtTA_{V1} de control no replica en la ausencia de dox o a niveles bajos de dox, se observó replicación eficiente a dox de 100 ng/ml, y la tasa de replicación aumentó más a dox de 1000 ng/ml. La replicación de HIV-rtTA_{V7} y HIVrtTA_{V14} también era completamente dependiente de dox. El HIV-rtTA_{V7} mostró un nivel bajo de replicación a dox de 1 ng/ml y replicación eficiente a 10 ng/ml. Para HIV-rtTA_{V14}, un alto nivel de replicación ya era aparente a dox de 1 ng/ml. Estos resultados demuestran que las variantes V7 y V14 mejoran significativamente replicación de HIV-rtTA a bajas concentraciones de dox. De manera importante, al igual que el HIV-rtTA original, estos virus no replican en la ausencia de dox. De manera aparente, la baja actividad de rtTA basal observada con la variante V14 en la ausencia de dox no es suficiente para soportar replicación viral.

También ensayamos la replicación de estas nuevas variantes de HIV-rtTA en la presencia de Tc y Mc (Fig. 7). Mientras que el HIV-rtTA_{v1} de control no replicó en la presencia de Tc o Mc de 500 ng/ml, tanto HIV-rtTA_{v7} como HIV-rtTA_{v14} muestran replicación eficiente con estos efectores. Estos resultados confirman que las variantes de rtTA V7 y V14 pueden activarse efectivamente mediante Tc y Mc.

5 Conclusión

Sustituciones de amino ácido en rtTA en posición 9, 19, 37, 67, 68, 86, 138, 157, 171, 177, 195 y/o 209, que se observan durante la evolución del virus HIV-rtTA, promueven la actividad de transcripción y/o sensibilidad de inductor de rtTA. Además, estas mutaciones amplían la especificidad de inductor de rtTA.

- 10 Las variantes rtTA más óptimas (V15 y V16) son 7 veces más activas a niveles altos de dox y 100 veces más sensibles a dox que el rtTA original. De manera importante, estas variants de rtTA no muestran actividad basal en la ausencia de dox. Una alta actividad y sensibilidad a dox de estos rTAs novedosos mejoran significativamente el desempeño del sistema Tet-on.

Materiales y Métodos

- 15 Cultivos de células. La línea SupT1 de célula T-linfocito humano (Smith et al. 1984) fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementada con suero bovino fetal al 10% (FCS), penicilina (100 U/ml), y estreptomocina (100 U/ml). HeLa X1/6 (Baron et al. 1997) es una línea de célula de carcinoma cervical derivada de HeLa, que contiene copias integradas cromosómicamente de promotor/luciferasa CMV-7tetO construcción de reportero pUHC13-3 (Gossen et al. 1992). Las células de carcinoma cervical HeLa X1/6 y C33A (ATCC HTB31) (Auersperg, 1964) se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco, suplementado con FCS al 10%, medio esencial mínimo, amino ácidos no esenciales, penicilina (100 U/ml), y estreptomocina (100 U/ml). Todos los cultivos de célula se mantuvieron a 37°C y CO₂ al 5%.

- 25 Replicación de virus. La construcción del clon molecular de HIV-rtTA se describió previamente (Verhoef et al. 2001; Das et al. 2004b). La variante HIV-rtTA usada en este estudio contiene la configuración 2ΔtetO (Marzio et al. 2001; Marzio et al. 2002) tanto en LTR 5' como LTR 3'. Se transfectaron células SupT1 (5x10⁶) con 5 μg del clon molecular HIV-rtTA mediante electroporación (250 V y 975 μF). Se indujo replicación viral con doxiciclina (dox, D-9891, Sigma, St. Louis, MO, USA), tetraciclina (Tc, Sigma T-3383) o minociclina (Mc, Sigma M-9511). El nivel de CA-p24 en el sobrenadante de cultivo libre de célula se determinó mediante captura de antígeno – ensayo por inmunoabsorción enlazado a enzima (ELISA, por su sigla en inglés) (Back et al. 1996).

- 30 Para la selección de virus evolucionados, se transfectaron células SupT1 con el clon molecular fHIV-rtTA_{F86Y A209T} (Das et al. 2004a), y cultivado en la presencia de dox de 1 μg/ml por hasta 200 días. El sobrenadante de cultivo que contiene virus se pasó a células frescas SupT1 en el pico de infección, tal como se determinó por la aparición masiva de sincitia. A intervalos regulares se tomaron muestras de célula y sobrenadante del cultivo y se almacenaron a -80°C para análisis posterior.

- 35 Análisis de ADN proviral y clonación de secuencias evolucionadas. Se aisló ADN celular total de las células infectadas, tal como se describe previamente (Das et al. 1997). Los genes de rtTA provirales se amplificaron por PCR con el cebador (primer) sense tTA1 (5'-ACAGCCATAGCAGTAGCTGAG-3') y el cebador (primer) antisense tTA-rev2 (6'-GATCAAGGATATCTTGCTTCGT-3'), y secuenciados con el kit secuenciador de ciclo terminador Bigdye (Applied Biosistemas, Foster citi, CA, USA). Los productos PCR se sometieron a digestión con XbaI y SmaI y usados para reemplazar el fragmento correspondiente en pCMV-rtTA, en el que la expresión de rtTA de tipo silvestre (rtTA2S-S2, (Urlinger et al. 2000)) se controla por el promotor precoz inmediato de citomegalovirus humano (CMV). Los genes rtTA mutantes se clonaron a partir de pCMV-rtTA al vector lanzadera (shuttle) pBlue3'LTRext-deltaU3-rtTA_{F86Y A209T}-2ΔtetO (Das et al. 2004a) usando los sitios XcmI y NdeI y se clonaron de vuelta posteriormente al clon molecular de HIV-rtTA como fragmentos de BamHI-BglII. Para introducir las mutaciones F67S y G138D a variants evolucionadas de rtTA, se realizó mutagénesis PCR (Mikaelian et al. 1992) con el plásmido pCMV-rtTA correspondiente y el cebador (primer) mutagénico (primer M) tTA-F67S (5'-CATACCCACTCCTGCCCCCTGGAAGGCCGA-3', subrayado el nucleótido con errores de apareamiento) o tTA-G138D (6'-GTCCGCCGTGGACCACCTTTACTGTTGGCT-3) y los cebadores generales 5'-TGGAGACGCCATCCACGCT-3' (primer 1), 5'-TGAAATCGAGTTTCTCCAGGCCACATATGA-3' (primer 2), y 5'-TCACTGCATTCTAGTTGTGGT-3' (primer 3). En breve, se realizaron reacciones PCR con primer M más primer 3, y con primer 1 más primer 2. Los productos PCR se purificaron, se mezclaron y se amplificaron PCR con primers 1 y 3 (véase referencia (Mikaelian et al. 1992) para detalles). Los genes rtTA mutados resultantes se clonaron como fragmentos EcoRI-BamHI en pCMV-rtTA. Todas las construcciones se verificaron mediante análisis de secuencia.

Ensayo de actividad de rtTA. Se usaron dos construcciones de reportero luciferasa de luciérnaga con diferentes configuraciones de promotor. pLTR-2ΔtetO-luc contiene el promotor de LTR-2ΔtetO derivado del clon molecular HIV-

rtTA (Marzio et al. 2001; Marzio et al. 2002). pCMV-7tetO-luc, llamado previamente pUHC13-3 (Gossen et al. 1992), contiene siete elementos tetO localizados corriente arriba de un promotor CMV mínimo. El plásmido pRL-CMV (Promega, Madison, WI, USA), en el que la expresión de luciferasa Renilla se controla por el promotor CMV, se usa como un control interno para permitir corrección para diferencias en eficiencia de transfección.

5 Células C33A y HeLa X1/6 se hicieron crecer en pozuelos de 2-cm² hasta confluencia de 60% y se transfectaron mediante método de precipitación de fosfato de calcio (Das et al. 1999). Se transfectaron células C33A con 0.4 ng de pCMV-rtTA (tipo silvestre o mutante), 20 ng de pLTR-2ΔtetO-luc o pCMV-7tetO-luc, 0.5 ng de pRL-CMV, y 980 ng de pBluescript como ADN soporte. Células HeLa X1/6 se transfectaron con 8 ng de pCMV-rtTA, 2.5 ng de pRL-CMV, y 990 ng de pBluescript. La cantidad de construcciones de ADN se optimizó para cada tipo de célula para mantener transactivación mediada por rtTA dentro del rango lineal y para evitar silenciamiento de factores de transcripción. Se cultivaron células por 48 horas en presencia de diferentes concentraciones de dox, Tc o Mc, y se lisaron en búfer Passive Lisis (Promega). Se determinaron actividades de luciferasa de luciérnaga y de renilla con el ensayo reportero de luciferasa dual (Promega). La actividad de las variantes de rtTA se calculó como la proporción de las actividades de luciferasa de luciérnaga y de renilla, y se corrigió para variación de sesión intermedia.

15 **Análisis de Western blot.** Se transfectaron células HeLa X1/6 a una confluencia de 90% con 1 μg de pCMV-rtTA tipo silvestre o mutante y 2 μl de lipdeectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en pozuelos de 2-cm². Se cultivaron células por 48 horas y se lisaron en 100 μl de búfer Passive Lisis. 10 μl del lisado se sometieron a separación sobre gel de SDS-poliacrilamida, y se transfirieron a membrana Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, USA). Para detección inmunológica de variantes rtTA se incubaron membranas con suero de conejo que contiene anticuerpo anti-TetR policlonales (Krueger et al. 2003). Se visualizaron anticuerpos enlazados con IgG anti-conejo enlazado a peroxidasa y el kit ECL+ (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) y se analizó con un generador de imágenes Storm 860 Imager (Amersham Biosciences).

EJEMPLO 2

25 Las vacunas HIV-1 basadas en un virus vivo-atenuado se han mostrado prometedoras en el modelo de macaco SIV, pero generalmente se consideran inseguras para uso en humanos. La mayor preocupación de seguridad es que la replicación crónica de bajo nivel del virus atenuado puede conducir eventualmente a una selección de instalador y a más variantes de virus patógeno. Idealmente a uno le gustaría restringir la replicación de un virus de vacuna a la ventana de tiempo que se necesita para provocar una respuesta inmune protectora. Previamente presentamos una propuesta de vacuna novedosa que usa un virus HIV-1 de vida condicional. En este virus de HIV-rtTA, el activador viral de transcripción Tat y su sitio de enlazamiento TAR se desactivaron por mutación y se reemplazaron funcionalmente por los componentes del sistema Tet-on. Este sistema en el que se controla rigurosamente la expresión génica por el efector no tóxico doxiciclina (dox), se aplica ampliamente para regular la expresión génica en eucariotas. El gen rtTA que codifica el activador de transcripción se insertó en lugar del gen nef, y los sitios de enlace de ADN de tet-operator (tetO) se colocaron en el promotor LTR viral. Este virus HIV-rtTA no replica en la ausencia de dox. Enlazar dox a rtTA dispara un cambio conformacional que permite que la proteína se enlace a ADN tetO, lo que da lugar a la activación de transcripción y a la replicación viral subsiguiente. Al vacunar con este virus, puede activarse temporalmente la replicación y controlarse hasta el punto necesitado para inducción del sistema inmune mediante administración transitoria de dox.

40 El uso potencial de este virus HIV-rtTA dependiente de dox como una vacuna genera nuevas preguntas de seguridad concernientes a la estabilidad general del sistema Tet-on introducido. Hay varias rutas de evolución hipotéticas hacia un virus que replica de manera constitutiva. Primero, el virus puede restablecer la función del sistema Tat-TAR, a pesar de las múltiples mutaciones desactivantes que fueron introducidas en ambos elementos para evitar reversión simple a la secuencia de tipo silvestre. En este escenario, el sistema rtTA-tetO controlado por dox se volverá superfluo y puede desactivarse en el tiempo por mutación o delección. Segundo, el promotor LTR viral podría volverse un elemento de transcripción constitutivo, por ejemplo por adquisición de un sitio de enlace para un factor de transcripción celular expresado de manera constitutiva. La replicación de un virus así no es dependiente de un transactivador codificado viralmente, ni Tat ni rtTA. Tercero, el eje rtTA-tetO introducido puede perder dependencia de dox, creando de esta manera un sistema Tet no controlado. Este escenario ocurriría, por ejemplo, a través de mutaciones adquiridas en la proteína rtTA que desplaza su conformación hacia el modo de enlazamiento de ADN, incluso en la ausencia de dox.

55 Para tratar estos temas de seguridad, seguimos la evolución de HIV-rtTA en cultivos de virus múltiples, independientes. Observamos pérdida de control de dox en varios cultivos que en todos los casos resultaron de una sustitución típica de amino ácido ya sea en posición 19 o 37 en la proteína de rtTA. Desarrollamos variantes de rtTA novedosas con amino ácidos alternativos en estas posiciones, y demostramos que las variantes de HIV-rtTA correspondientes no perdieron control de dox en cultivos de largo plazo. De esta manera mejoramos la estabilidad genética del sistema Tet-on y la vacuna candidata de HIV-rtTA bloqueando rutas de evolución no deseadas.

Cultivos de virus. El clon molecular infeccioso HIV-rtTA es un derivado del plásmido proviral HIV-1 LAI (Peden et al. 1991) y se describió previamente (Das et al. 2004b; Verhoef et al. 2001). HIV-rtTA usado en este estudio es la versión KYK que contiene la mutación Y26A desactivante en el gen Tat y cinco sustituciones de nucleótido en el motivo horquilla TAR. Este virus contiene el gen rTA2^s-S2 (Urlinger et al. 2000) en lugar del gen nef y ocho secuencias tetO en la región promotora LTR. El clon HIV-rtTA 2ΔtetO es idéntico a HIV-rtTA, pero con la configuración promotora 2ΔtetO optimizada (Marzio et al. 2001; Marzio et al. 2002). HIV-rtTA_{F86Y A209T} contiene el promotor LTR-2ΔtetO y el gen rTA_{F86Y A209T} recientemente descrito (Das et al. 2004a).

Se hicieron crecer células SupT1 T a 37°C y CO₂ al 5% en medio RPMI1640 que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS), 100 units/ml de penicilina, y 100 μg/ml de estreptomycin. Se transfectaron células SupT1 con clones moleculares HIV-rtTA mediante electroporación. En breve, se lavaron 5 x 10⁶ células en RPMI1640 con FBS de 20% y se mezclaron con 5 μg de ADN en 250 μl de RPMI1640 con FBS de 20%. Las células se sometieron a electroporación en cubetas de 0.4-cm a 250 V y 975 pF y a continuación se re-suspendieron en RPMI1640 con FBS de 10%. El nivel de CA-p24 en el sobrenadante de cultivo libre de célula se determinó por captura de antígeno - ensayo por inmunoabsorción enlazado a enzima (ELISA) (Back et al. 1996).

El experimento de evolución de 24 pozuelos inició con transfección de 40 μg del plásmido proviral HIV-rtTA a 2 x 10⁷ células SupT1. Se partieron las células en 24 cultivos independientes y se mantuvieron en la presencia de 1 μg/ml de dox (Sigma D-9891) por hasta 200 días. El sobrenadante de cultivo que contiene virus se pasó a células SupT1 frescas en el pico de infección, como se determinó por la aparición masiva de sincitia. A intervalos regulares se tomaron muestras de sobrenadante del cultivo y se ensayaron en infecciones paralelas con y sin dox. Se almacenaron muestras de célula a -80°C para análisis subsiguientes.

Análisis de ADN proviral y clonación de secuencias evolucionadas.

Células infectadas con HIV-rtTA se pelletizaron mediante centrifugación y se lavaron con suero salino amortiguado con fosfato. ADN se solubilizó re-suspendiendo las células en Tris-HCl de 10 mM (pH 8.0) – EDTA de 1 mM - Tween 20 al 0.5%, seguido de incubación con 200 μg/ml de proteinasa K a 56°C por 60 min y 95°C por 10 min. Secuencias de ADN provirales se amplificaron con PCR de un ADN celular total. El primer exón del gen Tat se amplificó con los primers KV1 (5'-CCATCGATACCGTCGACATAGCAGAATAGG-3') y 3'TAT (5'-CGGGAATTCTTACTGCTTTGATAGAGAAAC-3'). La región LTR-tetO se amplificó con los primers tTA-tetO1 (5'-CTCCCCGGGTAAGTAAGGAT-3') y C(N1) (5'-GGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTC-3'). El gen rTA se amplificó con los primers tTA1 (5'-ACAGCCATAGCAGTAGCTGAG-3') y tTA-rev2 (5'-GATCAAGGATATCTTGTCTTCGT-3'). Todos los fragmentos PCR se secuenciaron con el kit secuenciador de ciclo terminador Bigdye (Applied Biosistemas). Para la clonación de la secuencia rTAs mutada G19E o E37K al provirus HIV-rtTA, se sometieron a digestión fragmentos de rTA PCR con XcmI y SmaI y se clonó en los sitios correspondientes del vector lanzadera pBlue3'LTRext-deltaU3-rtTA-2ΔtetO (16). El fragmento BamHI-BglII del vector lanzadera fue usado para reemplazar la secuencia correspondiente en HIV-rtTA 2ΔtetO.

Construcción de variantes HIV-rtTA novedosas y plásmidos de expresión de rTA.

Variantes de HIV-rtTA con un codón G alternativo (GGU en lugar de GGA) en posición 19 de rTA y con un aminoácido tipo silvestre (E) o alternativo (D, F, L, N, Q, R, S) en posición 37 se construyeron por mutagénesis dirigida a oligonucleótido. El oligonucleótido G19 (5'-ATAACCATGTCTAGACTGGACAAGAGCAAAGTCATAAACTCTGCTCTGGAATTAATCAATGGTGTGCGGTATCGAAGGCCTGACGACAAGGAACTCGC T-3', nucleótidos mutados subrayados) se emparejó mediante enlace de hidrógeno (annealed) al oligonucleótido rev-37 (5'-AGCAGGGCCCGCTTGTTCCTTCACGTGCCAGTACAGGGTAGGCTGXXXA ACTCCCAGCTTTTGAGCGAGTTTCCTTGTGCTCAGGCCTTCGA- 3', donde XXX corresponde al aminoácido 37; esta tripleta es CTC por E, ATC por D, GAA por F, AAG por L, ATT por N, CTG por Q, GCG por R, y AGA por S), ambas hebras se completaron con polimerasa de ADN Klenow en la presencia de dNTPs, digerida con XcmI y ApaI, y ligada al vector lanzadera digerido de manera similar pBlue3'LTRext-deltaU3-rtTA_{F86Y A209T}-2ΔtetO (Das et al. 2004a). Los fragmentos BamHI-BglII del vector lanzadera se usaron para reemplazar la secuencia correspondiente en HIV-rtTA 2ΔtetO.

El plásmido pCMV-rtTA contiene el gen rTA2s-S2 en el vector de expresión pUHD141-1/X (Urlinger et al. 2000). Para generar variantes de rTA con diferentes aminoácidos en posición 19 o 37, se efectuó PCR en pCMV-rtTA con el primer sense ryom-rtTA-19 (5'-TTCACCATGTCTAGACTGGACAAGAGCAAAGTCATAAACTCTGCTCTGGAATTAATCAATNNKGTGCGGTATCGAAGGCCTGACGA-3', nucleótido mutado subrayado, donde K corresponde a T o G, y N corresponde a T, C, A o G) más el primer antisense CMV2 (5'-TCACTGCATTCTAGTTGTGGT-3') o con el primer sense CMV1 (5'-TGGAGACGCCATCCACGCT-3') más el primer antisense ryom-rtTA-37 (5'-AGCAGGGCCCGCTTGTTCCTTCACGTGCCAGTACAGGGTAGGCTGMNN AACTCCCAGCTTTTGAGCGA -3', nucleótido mutado subrayado donde M corresponde a A o C, y N corresponde a T, C, A o G), respectivamente. Los rTAs de secuencia mutada se clonaron como fragmentos de XbaI-ApaI en pCMV-rtTA_{F86Y A209T} (Das et al. 2004a). Todas las construcciones se verificaron mediante análisis de secuencia. Para combinar las mutaciones G19F (UUU

codón) y E37L (CUU codón), el fragmento StuI-BamHI que contiene E37L de pCMV-rtTAE37L se usó para reemplazar la secuencia correspondiente en pCMV-rtTAG19F, resultando en pCMV-rtTAG19F E37L. La secuencia rtTAG19F E37L se clonó en el vector lanzadera pBlue3'LTRext-deltaU3-rtTAF_{86Y} A_{209T}-2ΔtetO (Das et al. 2004a) usando sitios XcmI y NdeI y a continuación se clonó en el clon molecular HIV-rtTA 2ΔtetO como un fragmento BamHI-BglII.

Ensayo de actividad rtTA.

Células HeLa X1/6 (Baron et al. 1997) se derivan de la línea celular de carcinoma cervical HeLa y copias integradas cromosómicamente de la construcción de reportero de luciferasa de luciérnaga CMV-7tetO pUHC13-3 (Gossen et al. 1992). Se hicieron crecer células a 37°C y CO₂ al 5% como una monocapa en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con FBS al 10%, amino ácidos no esenciales de medio esencial mínimo, 100 unidades/ml de penicilina, y 100 μg/ml estreptomycin.

Se hicieron crecer células HeLa X1/6 en pozuelos de 2-cm² a una confluencia de 60% y se transfectaron mediante método de precipitación de fosfato de calcio. 1 μg de mezcla de ADN en 15 μl de agua se mezcló con 25 μl de HEPES de 50 mM (pH 7.1)- NaCl de 250 mM - Na₂HPO₄ de 1.5 mM y 10 μl de CaCl₂ de 0.6 M, se incubó a temperatura ambiente por 20 min y se adicionó al medio de cultivo. La mezcla de ADN consistió de 8 ng de pCMV-rtTA, 2.5 ng de pRL-CMV, y 990 ng de pBluescript como ADN de soporte. El plásmido pRL-CMV (Promega), en el que la expresión de luciferasa de renilla se controla por el promotor de CMV, se usó como un control interno para permitir corrección por diferencias en eficiencia de transfección. Se cultivaron células después de la transfección por 48 horas a diferentes concentraciones de dox y después se lisaron en búfer Passive Lysis (Promega). Se determinaron actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla con el ensayo reportero de luciferasa dual (Dual-Luciferase Reporter Assay) (Promega). La expresión de luciferasa de luciérnaga y renilla estaba dentro del rango lineal y no se observaron efectos de silenciamiento. La actividad de las variantes de rtTA se calculó como la proporción de las actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla y se corrigió para variación de sesión intermedia (Retrovirología, presentado).

Resultados

Aparición de variantes de HIV-rtTA con dependencia reducida de dox. Previamente hemos reportado sobre la construcción de una variante de HIV-1 viva condicionalmente (Das et al. 2004b; Verhoef et al. 2001), en la que los elementos Tat-TAR naturales que controlan la expresión génica viral y la replicación se inactivaron por mutación y se reemplazaron funcionalmente por los elementos rtTA-tetO del sistema Tet-on para expresión génica inducible (Fig. 8A). Este virus HIV-rtTA no replica de manera constitutiva sino exclusivamente en la presencia de dox. Recientemente reportamos que la replicación a largo plazo de este virus dio lugar a una reorganización de los elementos tetO y a sustitución de amino ácido en la proteína de rtTA lo que mejoró significativamente la replicación viral sin una pérdida de control de dox. Anticipamos que el virus HIV-rtTA también podría evolucionar en direcciones diferentes (véase introducción) y este estudio se enfocó, por lo tanto, en la aparición de variantes de virus que ya no dependían de dox para replicación. Iniciamos cultivos múltiples de virus a largo plazo y seguimos el desarrollo de la independencia de dox. El enfoque de evolución y el trazado de flujo de los análisis subsiguientes se ilustran en la Fig. 8B. El virus HIV-rtTA se pasó extensamente en la presencia de dox en 24 cultivos independientes. En varios puntos de tiempo se tomaron muestras de sobrenadante del cultivo y se ensayaron en una infección paralela sin dox para determinar la dependencia de dox del virus evolucionado. Los resultados para todos los 24 cultivos se resumen en Fig. 8C (cuadros negros). Observamos una reducción significativa en el número de virus dependientes de dox en el transcurso de 60 días de cultivar, y solo tres cultivos permanecieron dependientes de dox después de 125 días.

Las curvas de replicación del virus HIV-rtTA original y dos cultivos de virus independientes de dox se muestran en Fig 9. La muestra de virus C5 sí replicó sin dox pero aún puede activarse por dox hasta cierta extensión, mientras que la muestra de virus C6 replicó con eficiencia similar con y sin dox. El ADN celular total con provirus integrado se aisló a partir de ocho cultivos de HIV-rtTA independientes de dox. Analizamos la secuencia tanto del motivo Tat-TAR "viejo" como del motivo rtTA-tetO "nuevo" tal como se presentan en la población de virus. En todos los cultivos las secuencias de Tat y TAR contenían las mutaciones originales, lo que indica que el eje Tat-TAR de activación de transcripción no se había reparado. En contraste, en todos los cultivos observamos la reorganización característica de elementos tetO que se habían mostrado previamente para mejorar la replicación de HIV-rtTA dependiente de dox (Marzio et al. 2001; Marzio et al. 2002). Adicionalmente, virus de todos los cultivos independientes de dox habían adquirido o bien una mutación G19E o una mutación E37K en el gen rtTA (Fig. 8D). Dos de los cultivos (B6 y C6) contenían sustituciones adicionales de amino ácido. La selección repetida de G19E o E37K en cultivos múltiples, combinada con su ausencia en los tres cultivos restantes (no se muestran datos), sugiere firmemente su enlazamiento al fenotipo independiente de dox adquirido.

Sustituciones de amino ácidos en rtTA confiere pérdida de control de dox.

Para demostrar que estas mutaciones de rTA son responsables para la replicación viral observada sin dox, construimos clones moleculares de HIV-rtTA con la mutación de G19E o E37K en el gen rTA y ensayamos su replicación a diferentes concentraciones de dox (Fig. 10). HIV-rtTA con rTA de tipo silvestre no replicaron sin dox y mostraron un incremento graduado en replicación viral con concentraciones crecientes de dox. HIV-rtTA_{G19E} replicó eficientemente tanto con como sin dox. HIV-rtTA_{E87K} también replicó sin dox, pero la replicación es más eficiente con dox. Estos resultados demuestran que la mutación G19E o E37K es suficiente para reducir la dependencia de dox del virus HIV -rtTA.

Los resultados descritos arriba se obtuvieron con el virus original de HIV-rtTA, el cual replica relativamente mal. También ensayamos la estabilidad genética de dos variantes mejoradas de HIV-rtTA en un ensayo similar de cultivo a largo plazo de 24 pozuelos. HIV-rtTA 2ΔtetO es idéntico al HIV-rtTA, pero con el promotor LTR-2ΔtetO mejorado (Marzio et al. 2001; Marzio et al. 2002), y HIV-rtTA_{F86Y A209T} contiene adicionalmente el gen rTA_{F86Y A209T} mejorado (Das et al. 2004a). Con ambos virus observamos de nuevo la aparición de variantes que replican sin dox, aunque a una rata significativamente más baja en comparación con el HIV-rtTA original (Fig. 8C). Mientras que el HIV-rtTA original perdió el control dox en 50% de los cultivos en el transcurso de 50 días, 50% de los cultivos de HIV-rtTA 2ΔtetO perdieron dependencia de dox en aproximadamente 75 días, y más de 50% de los cultivos de HIV-rtTA_{F86Y A209T} todavía estaban plenamente dependientes de dox después de 120 días. Aparentemente, estas nuevas variantes de HIV-rtTA no solo tienen una capacidad de replicación mejorada, pero también una tendencia más baja a perder control dox. El análisis de secuencia de dos cultivos HIV-rtTA_{F86Y A209T} independientes de dox reveló la mutación G19E en ambos casos.

20 Variantes de HIV-rtTA con codones alternativos en posiciones de rTA 19 y 37.

En los experimentos de evolución, observamos sustituciones de amino ácido muy específicas que redujeron la dependencia de dox en solo dos posiciones de rTA (G19E y E37K). La introducción de codones rTA alternativos puede hacer más difíciles tales sustituciones específicas de amino ácidos o incluso evitar estas rutas indeseadas de evolución. Por ejemplo, la mutación de G19E involucra un cambio de codón GGA a GAA, y la transición G-a-A es el error más frecuente durante la transcripción inversa de HIV-1. Una introducción de un codón alternativo de Gli (GGU o GGC) requeriría una mutación de dos impactos mucho más difíciles, que incluye una transversión, para crear un codón Glu (GAA o GAG). Una diferencia así en la frecuencia de mutación influye fuertemente el curso de la evolución de HIV-1.

No es posible una estrategia similar para E37K porque todos los codones Glu posibles (GAA y GAG) requieren solo una mutación individual G-a-A para tornar a codón Lis (AAA o AAG). Como una estrategia alternativa de bloqueo podríamos reemplazar el codón E37 con un codón no-Glu que sería más difícil de transformar a un codón Lis. Sin embargo, una sustitución así de amino ácidos no debería afectar idealmente la actividad o la dependencia de dox de la proteína rTA. Primero examinamos variación natural en esta posición en el represor Tet (TetR). La proteína rTA se basa en TetR de clase B E. coli (TetR^B), pero hay seis clases de TetR adicionales (A, C-E, G, H). TetR de clase D, E y H también tienen el Glu en posición 37, sino TetR de clase A, C y G tienen un Gln, en cambio. La evolución de un codón Gln (CAA o CAG) a un codón Lis (AAA o AAG) requeriría solo una mutación C-a-A individual, pero esta transversión con frecuencia se observa menos en evolución de HIV-1. Por lo tanto, construimos una variante de HIV-rtTA con un codón Gln (CAG) en posición 37 (E37Q). Adicionalmente, construimos variantes con Asp (GAU; E37D), Asn (AAU; E37N), Ser (UCU; E37S), Arg (CGC; E37R), Fe (UUC; E37F) o con un codón Leu (CUU; E37L). La sustitución E37D deja intacta la naturaleza ácida del residuo. Las mutaciones E37N y E37S, como la variante natural E37Q, dan lugar a residuos polares, residuos no cargados. Las mutaciones E37F y E37L dan lugar a residuos hidrófugos. La sustitución E37R crea un residuo básico que es similar a la mutación E37K seleccionada a través de evolución viral. Cuando se permite por la degeneración del codón genético, seleccionamos el codón que requiere la mayor parte de mutaciones para convertir a un codón Lis. Por ejemplo, un codón CGC, antes que un codón AGA, se seleccionó para la variante E37R. Además, todas las nuevas variantes HIV-rtTA contienen el codón Gli alternativo (GGU) en posición 19.

Ensayamos una replicación de estas variantes HIV-rtTA novedosos en células SupT1 con y sin dox (Fig. 11). Como se esperaba, el virus con el codón silente cambiado en posición 19 (E37) replicó de manera dependiente de dox. Las variantes E37L, E37N, E37F, E37Q y E37R también mostraron replicación eficiente y dependiente de dox. La variante E37D no replicó ni con ni sin dox. De manera interesante, la variante E37S replicó de manera eficiente tanto con como sin dox, que es un fenotipo similar a aquel de la variante E37K. Este estudio inicial demuestra que el fenotipo HIV-rtTA es difícil de predecir a partir de la naturaleza química del residuo, por ejemplo E37R, es similar a E37K, pero no reduce la dependencia de dox. Para construir un virus dependiente de dox más estable, parece necesario, por lo tanto, conocer el impacto de todas las sustituciones posibles de amino ácido en posición 37.

55 Ensayo de todas las variantes de rTA posibles en posición 37.

Construimos plásmidos de expresión rTA con todos los amino ácidos posibles en posición 37. La actividad de estas variantes se ensayó mediante transfección a células HeLa X1/6 (Baron et al. 1997) que contienen copias integradas

establecimiento de la construcción reportera de luciferasa CMV-7tetO (Gossen et al. 1992). Se cultivaron células transfectadas por dos días en la presencia de dox de 0-1000 ng/ml. Determinamos a continuación el nivel intracelular de luciferasa, el cual refleja actividad de rtTA. Como se muestra en la Fig. 12A, la actividad de estas 20 variantes de rtTA varía considerablemente. La mayoría de variantes no muestra actividad, o muestra pero muy baja, en la ausencia de dox, y su actividad aumenta con niveles crecientes de dox.

La comparación de los datos de actividad de rtTA (Fig. 12A) con la capacidad de replicación del conjunto seleccionado de variantes de HIV-rtTA (Fig. 11) nos permite determinar el nivel de actividad de rtTA que se requiere para replicación viral. Las variantes 37F, 37L, 37N, 37Q y 37R no muestran actividad, o muestran pero muy baja, a cero dox (menos o igual a 0.06% de la actividad de rtTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml), y virus que llevan estas variantes de rtTA no replican sin dox. La baja actividad (0.09%) de la variante 37D a dox de 1000 ng/ml tampoco es suficiente para replicación viral. Las variantes 37K y 37S muestran actividad de 0.19% y 1% sin dox, respectivamente. Este nivel de actividad es aparentemente suficiente para conducir a un nivel bajo de replicación viral. El umbral de actividad de rtTA que es suficiente para replicación de HIV-rtTA se estableció por lo tanto a 0.1%. Esto significaría que no solo HIV-rtTA_{E37K} y HIV-rtTA_{E37S}, sino también HIV-rtTA_{E37A} replicará en la ausencia de dox. Los codones que corresponden a estos amino ácidos son por lo tanto gris oscuro (pero no negros) en la tabla de codón (Fig. 12C), y debe prevenirse la evolución hacia estos codones. Todas las otras variantes, excepto por el mutante 37D inactivo, muestran un fenotipo similar al tipo silvestre de rtTA, es decir actividad por debajo de 0.1% a cero dox y mucho más alto que 0.1% a dox de 1000 ng/ml. Se espera que virus HIV-rtTA con estas variantes repliquen de una manera dependiente de dox. Estos amino ácidos son ligeramente grises en la tabla de codón, y la evolución hacia ellos no resultaría en una pérdida de dependencia de dox. Los codones D y stop se marcan en negro ya que los virus correspondientes no serán competentes para replicación.

En la tabla de codón cada cambio en fila o columna representa una sustitución de nucleótido individual. Esta tabla de codón de colores (Fig. 12C) facilita así la identificación de codones en posición 37 que preservan dependencia de dox (gris claro) y que requieren múltiples mutaciones de nucleótidos para convertir a un codón que permite replicación en la ausencia de dox (gris oscuro). Los codones Leu CUN cumplen estos requerimientos de seguridad.

Ensayo de todas las variantes de rtTA en posición 19.

Como la mutación E37K, la mutación G19E causa replicación viral en la ausencia de dox. Para revelar si otras sustituciones de amino ácidos en esta posición resultaría similarmente en una pérdida de dependencia de dox, construimos plásmidos de expresión de rtTA con todos los posibles amino ácidos en posición 19. La actividad de estas variantes de rtTA se analizó como se describe arriba para las variantes de posición 37. Como se muestra en la Fig. 12B, la mayoría de variantes no muestran actividad, o muestran actividad muy baja (menos de 0.1%) sin dox, y su actividad aumenta con niveles crecientes de dox. En contraste, la variante 19P es inactiva, y la variante 19E muestra actividad de 3% sin dox. Esta actividad basal relativamente alta de 19E está en concordancia con la replicación eficiente del virus HIV-rtTA correspondiente sin dox. Hay múltiples codones posibles en posición 19 que preservan dependencia de dox (coloreado gris claro en Fig. 12D) y que requieren múltiples mutaciones de nucleótido para convertirse en un codón que permite replicación en la ausencia de dox (coloreado gris oscuro). Por ejemplo, el codón de Fe UUU cumple muy bien estos requerimientos de seguridad puesto que requiere tres transversiones para convertir en un codón Glu.

rtTA con mutaciones de cerrojo de seguridad previene la pérdida de control de dox.

Construimos una variante de rtTA que combina las dos mutaciones de cerrojo de seguridad: Fe (UUU) en posición 19 (G19F) y Leu (CUU) en posición 37 (E37L). Esta variante de rtTA muestra actividad basal muy baja (menos de 0.1%) y su actividad aumenta gradualmente con niveles crecientes de dox (figura 13A). Aunque rtTAG19F E37L es menos activo que el tipo silvestre de rtTA a concentraciones bajas de dox, es altamente activo a niveles altos de dox. Por consiguiente, HIV-rtTAG19F E37L no replica en la ausencia de dox o a niveles bajos de dox pero sí replica eficientemente a niveles altos de dox (Fig. 13C). Ensayamos la estabilidad genética de este virus en 24 cultivos de largo plazo con dox (Fig. 8C). El virus HIV-rtTAG19F E37L nunca perdió control de dox hasta 200 días de cultivo. Este resultado demuestra la estabilidad genética aumentada, y así la seguridad mejorada de la variante de HIV-rtTA novedosa.

Variantes de rtTA con aminoácido alternativo en posición 19 o 37 demuestran una actividad de transcripción y sensibilidad de dox mejoradas. La mayoría de las variantes de rtTA con un amino ácido alternativo en posición 19 (alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina o tirosina) y algunas de las variantes de rtTA con un amino ácido alternativo en posición 37 (cisteína, metionina, glutamina, arginina o treonina) muestran una actividad incrementada de transcripción a una baja concentración de dox y/o una actividad aumentada de transcripción a una alta concentración de dox comparada con el rtTA original (tipo silvestre) (Fig. 12 A y B). Estos resultados demuestran que estas sustituciones de amino ácidos en posición 19 y 37 aumentan la actividad y/o sensibilidad de dox de rtTA.

Conclusiones

5 Cuando se incorpora rtTA conocido en la actualidad a un sistema replicante (por ejemplo a un replicón), rtTA está en riesgo de perder control de dox debido a mutaciones en el amino ácido rtTA posición 19 y/o 37 adquiridas durante la evolución del sistema. Tal evolución indeseada se previene mediante la introducción de codones alternativos en estas posiciones de amino ácido. Codones alternativos preferidos requieren múltiples sustituciones de nucleótido para convertir en un codón que codifica un amino ácido que actuaría como mediador de la pérdida de control de dox de rtTA. Como un ejemplo demostramos que un codón de fenilalanina (UUU) en posición 19 de amino ácido de rtTA y un codón de leucina (CUU) en posición 37 mejora la estabilidad genética de rtTA y previene al menos en parte la pérdida de control de dox. Nuestros resultados demuestran que otros codones de amino ácido en posición 19 (que codifica alanina, cisteína, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, arginina, serina, treonina, valina, triptófano o tirosina) y posición 37 (que codifica histidina, leucina o arginina) mejoran de manera similar la estabilidad genética de rtTA.

15 La introducción de amino ácidos alternativos en posición 19 y/o 37 de amino ácido de rtTA mejoran la actividad de transcripción y/o sensibilidad de inductor de rtTA. De manera específica, la introducción de alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina o tirosina en posición 19 de amino ácido de rtTA, y/o la introducción de cisteína, metionina, glutamina, arginina o treonina en posición 37 de amino ácido de rtTA resulta en una actividad incrementada de transcripción y/o sensibilidad de rtTA.

EJEMPLO 3: Variantes mejoradas de sc rtTA

20 Recientemente se han desarrollado transreguladores Tet de cadena individual en los que dos dominios TetR se conectan mediante un enlazador péptido y un dominio de activación VP16 o dominio represor KRAB se posiciona en el terminal C (Krueger et al. 2003). Estos transreguladores se pliegan intramolecularmente y no dimerizan entre sí. Desafortunadamente, la versión de cadena individual de rtTA (sc rtTA) exhibe actividad reducida cuando se compara con el rtTA regular y esta baja actividad puede frustrar su uso en aplicaciones que requieren un sistema Tet-on activo.

30 Hemos incorporado el gen rtTA y los elementos tetO al genoma HIV-1 para controlar replicación de virus. Durante el cultivo de este virus dependiente de dox, se seleccionó la evolución viral espontánea para variantes de virus mejoradas, en las que se optimizó el sistema Tet-on introducido. Hemos identificado varias sustituciones de amino ácidos en el gen de rtTA que promueve mucho la actividad de transcripción y la sensibilidad de dox del transactivador. Para ensayar si estas mutaciones mejoran de manera similar otros transactivadores a base de TetR, los introdujimos al sc rtTA. Todas las mutaciones aumentaron la actividad de sc rtTA. La variante de sc rtTA más activa es ~30 veces más activa que el sc rtTA original, y es casi tan activa como el rtTA regular.

Materiales y Métodos

35 Construcción de variantes de sc rtTA. Los plásmidos pCMV-rtTA y pCMV-scrTA contienen los genes rtTA^S-S2 y sc rtTA2-S2, respectivamente, clonados en el vector de expresión pUHD141-1/X (Krueger et al. 2003; Urlinger et al. 2000). El gen sc rtTA contiene dos dominios TetR y un dominio de activación individual. Para introducir mutaciones al dominio TetR de terminal, el fragmento EcoRI-BfuAI de pCMV-scrTA se reemplazó con el fragmento correspondiente del plásmido pCMV-rtTA apropiado. Se introdujeron mutaciones al dominio TetR de terminal C de sc rtTA mediante mutagénesis PCR (Mikaelian et al. 1992) sobre pCMV-scrTA con los primers mutagénicos (primer M) scrTA-V9I (5'-GGCTCTAGATCTCGTTTAGATAAAAAGTAAAATCATTAAACAGCGCA-3'), scrTA-F67S (5'-AGGCACCACTACTCTTGCCCTTTA-3'), scrTA_{F86Y} (5'-AACGCTAAAAGTTATAGATGTGCT-3'), o scrTA-G138D (5'-CAGCGCTGTGGACCACTTTACTTTA-3') y los primers 5'-TAATCATATGTGGCCTGGAGAA-3' (primer 1), 5'-AGGCGTATTGATCAATTCAAGGCCGAATAAG-3' (primer 2), y 5'-TCACTGCATTCTAGTTGTGGT-3' (primer 3) tal como se describe arriba para las mutaciones tTA. Los productos finales PCR se digirieron con BglII y SmaI y se usaron para reemplazar el fragmento correspondiente de pCMV-scrTA. Todas las construcciones se verificaron mediante análisis de secuencia.

50 Ensayo de cultivo celular y actividad de rtTA. La actividad de rtTA y sc rtTA se ensayó en células HeLa X1/6 (Baron et al. 1997), que son células derivadas de HeLa que contienen copias integradas cromosómicamente de construcción reportero de pUHC13-3 de luciferasa CMV-7tetO (Gossen et al. 1992). Se cultivaron células a 37°C y CO₂ de 5% en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10%, amino ácidos no esenciales de medio esencial mínimo, penicilina (100 U/ml), y estreptomina (100 µg/ml). Se hicieron crecer células en pozuelos de 2-cm² a una confluencia de 60% y se transflectaron con los plásmidos de expresión pCMVrtTA o pCMV-scrTA y el plásmido pRL-CMV (Promega) mediante el método de preipitación de fosfato de calcio. pRL-CMV expresa luciferasa de renilla a partir de promotor CMV y se usó como un control interno para permitir corrección por diferencias en eficiencia de transfección. 1 µg de mezcla de AND en 15 µl de agua se mezcló con 25 µl de HEPES de 60 mM (pH 7.1)- NaCl de 250 mM - Na₂HPO₄ de 1.5 mM y 10 µl de CaCl₂ de 0.6 M, se

mezcló a temperatura ambiente por 20 min, y se adicionó al medio de cultivo. La mezcla de ADN consistió en 20 ng de pCMV-scrTA o de pCMV-rtTA, 2 ng de pRL-CMV, y 978 ng de pBluescript para ensayo de actividad sc rtTA o rtTA. Se cultivaron células después de transfección por 48 horas a diferentes concentraciones de dox (D-9891, Sigma) y luego se lisaron en búfer Passive Lysis (Promega). Se determinaron actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla con el ensayo reportero de luciferasa dual (Promega). La expresión de luciferasa de luciérnaga y renilla estaba dentro del rango lineal y no se observaron efectos de silenciamiento. La actividad del transactivador se calculó como la proporción de actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla, y se corrigió por variación de sesión intermedia.

Resultados

10 **Mutaciones observadas en rtTA mejoran actividad de sc rtTA.**

En sc rtTA, se conectan dos dominios TetR cabeza a cola mediante un enlazador péptido, y un dominio de activación individual se fusiona al dominio TetR de terminal C. Las mutaciones que sí mejoran la actividad de rtTA se posicionan todas dentro del dominio TetR de la proteína (Fig. 16). Para ensayar si estas mutaciones benéficas de rtTA también pueden mejorar la actividad y la sensibilidad de dox de sc rtTA, los introdujimos a uno o a ambos dominios TetR de sc rtTA. Se analizó la actividad de estas variantes en células HeLa X1/6 y se comparó con la actividad de rtTA y del sc rtTA original (tipo silvestre) (Fig. 18). Tanto rtTA y sc rtTA de tipo silvestre no muestran actividad de fondo sin dox y su actividad aumenta gradualmente con niveles crecientes de dox. Sin embargo, la actividad inducida de sc rtTA es mucho más baja que la de rtTA en todas las concentraciones de dox ensayadas. Por ejemplo, sc rtTA es cerca de 40 veces menos activa que rtTA a dox de 1000 ng/ml (Fig. 18A). Introducción de la mutación F86Y al dominio TetR de terminal N incrementó la actividad de sc rtTA ~10 veces a todos los niveles de dox, pero no afectaron actividad de fondo. La introducción adicional de la mutación V9I a la variante F86Y también mejoró la actividad de sc rtTA (aunque marginalmente), mientras que la adición de las mutaciones F67S, G138D, o V9I más G138D mejoró además actividad de sc rtTA ~2 veces a todos los niveles de dox. La actividad de fondo de estas variantes no se incrementó.

Resultados similares se obtuvieron al introducir las mutaciones al dominio TetR terminal C de sc rtTA (Fig. 18B). Si embargo, ninguna de estas variantes es tan activa como sus contrapartes con mutaciones en el dominio TetR terminal N. La mutación F86Y incrementó la actividad de sc rtTA ~3 veces, y la adición de las mutaciones F67S, G138D, o V9I más G138D incrementaron además la actividad ~2 veces. Estos resultados demuestran que la actividad de sc rtTA se mejora mediante mutaciones en cualquier dominio TetR. Las mutaciones introducidas al dominio TetR terminal N tienen un efecto más grande sobre actividad de sc rtTA que las mismas mutaciones en el dominio C-terminal.

La introducción de las mutaciones en ambos dominios TetR resultaron en las variantes más activas de sc rtTA (Fig. 18C). A niveles altos de dox (500-1000 ng/ml), todas estas variantes demuestran una actividad más alta de transcripción que las variantes correspondientes con mutaciones en solo uno de los dos dominios TetR (Fig. 18A y 18B). Por ejemplo, sc rtTA con la mutación F86Y en ambos dominios TetR es ~13 veces más activo que el sc rtTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml, mientras que la misma mutación en el dominio TetR terminal N o en el terminal C incrementó actividad de sc rtTA ~10 veces y ~3 veces, respectivamente. Las variantes que llevan las mutaciones F67S, G138D, o V9I más G138D adicionalmente a la mutación F86Y en ambos dominios TetR son no solo más activas a altos niveles de dox, pero también más activas a bajos niveles de dox (10-100 ng/ml). De hecho, estas variantes demuestran una actividad de transcripción y sensibilidad a dox similares a rtTA.

Discusión

Hemos identificado sustituciones de amino ácido en rtTA que mejoran mucho la actividad de transcripción y sensibilidad a dox del transactivador. En este EJEMPLO, ensayamos si estas mutaciones afectan de manera similar a sc rtTA. Nuestros resultados demuestran que todas las mutaciones no aumentaron significativamente la actividad de sc rtTA. Ambos transactivadores rtTA y sc rtTA se activaron mediante doxiciclina. Nuestros resultados demuestran que la actividad de sc rtTA se mejora significativamente mediante introducción de al menos una mutación que aumenta la actividad de rtTA. La variantes más activa de sc rtTA en este estudio se obtuvo introduciendo mutaciones benéficas en ambos dominios TetR. Sin embargo, sc rtTA también se mejora mediante al menos una mutación en solo uno de los dominios TetR. Las variantes sc rtTA con mutaciones benéficas en el dominio TetR N-terminal parecen ser más activos que las variantes con las mismas mutaciones en el dominio TetR C-terminal.

La variante de sc rtTA con las mutaciones F67S y F86Y en ambos dominios TetR es ~30 veces más activa que el sc rtTA original a niveles altos de dox, y no muestra ninguna actividad de fondo en la ausencia de dox. Este sc rtTA novedoso es casi tan activo y sensible a dox como rtTA, y por lo tanto es adecuado para reemplazar el rtTA regular en aplicaciones donde se usan múltiples sistemas regulatorios a base de TetR en la misma célula u organismo.

Conclusión

La actividad de transcripción y la sensibilidad de inductor de la actividad de rtTA de cadena individual se mejora significativamente mediante la introducción de sustituciones de amino ácido que encontramos nosotros para mejorar la actividad de transcripción y sensibilidad de inductor de rtTA. Así, por ejemplo, se generaron variantes de sc rTA con una actividad incrementada de transcripción y una sensibilidad incrementada a dox de hasta ~30 veces mediante la introducción de una sustitución de amino ácido F86Y, a V9I, a F67S y/o a G138D al sc rTA original.

EJEMPLO 4: Desarrollo de variantes rtTA novedosas con estabilidad genética mejorada: Introducción de amino ácidos alternativos en posición 19, 37 y 56 de rtTA.

Hemos demostrado que la replicación de HIV-rtTA a largo plazo resultó en variantes de virus que ya no dependen de dox para replicación. Esta dependencia reducida de dox se asoció con una sustitución de amino ácido en la proteína de rtTA ya sea en la posición 19 (glicina a glutamato; G19E) o en la posición 37 (glutamato a lisina; E37K). Desarrollamos una variante de HIVrtTA con mutaciones de cerrojo de seguridad (G19F y E37L) en el gen rTA para bloquear estas rutas no deseadas de evolución. La variante novedosa mostró estabilidad genética mejorada y no perdió control de dox en cultivos de largo plazo con dox (véase EJEMPLO 2).

Como una vacuna, la replicación de HIV-rtTA se prendió temporalmente para inducir respuestas inmunes anti-virales. El retiro subsiguiente de dox impone presión alternativa de evolución sobre el virus que el cultivo de largo plazo con dox. De manera específica hay un riesgo de variantes de rtTA con un fenotipo como el tTA, las cuales son activas sin dox y se inhiben por dox, que aparecen en experimentos de lavado de dox, mientras que tales variantes se seleccionan en contra en la presencia de dox. Por lo tanto nosotros seguimos la evolución de HIV-rtTA en cultivos de virus independientes, múltiples que se activaron transitoriamente por dox. El virus perdió efectivamente control de dox en un número significativo de cultivos después de retirar dox. Nosotros identificamos una sustitución típica de amino ácido en posición 56 en la proteína rtTA, la cual se encontró responsable de la replicación independiente de dox. Esta mutación no se había observado nunca en cultivos de largo plazo con dox. Desarrollamos una variante de rtTA novedosa que bloquea la ruta no deseada de evolución y así se mejora la estabilidad genética y seguridad de HIV-rtTA.

Materiales y Métodos

Cultivos de virus. El clon molecular infeccioso de HIV-rtTA es un derivado del plásmido proviral HIV-1 LAI proviral (Peden et al, 1991) y se describió previamente (Das et al, 2004b; Verhoef et al, 2001). El HIV-rtTA usado en este estudio contiene la mutación Y26A desactivante en el gen Tat, cinco sustituciones de nucleótido en el motivo horquilla de TAR, el gen rTAF_{86Y A209T} (Das et al, 2004a) en lugar del gen nef, y la configuración de promotor LTR-2ΔtetO (Marzio et al, 2001; Marzio et al, 2002).

Se cultivaron células T SupT1 a 37°C y CO₂ al 5% en medio RPMI1640 que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS), penicilina de 100 unidades/ml, y estreptomycin de 100 µg/ml. Se transfectaron células SupT1 con clones moleculares de HIV-rtTA mediante electroporación. En breve, se lavaron 5 x 10⁶ células en RPMI1640 con FBS al 20% y se mezclaron con 5 µg de DNA en 250 µl de RPMI1640 con FBS al 20%. Se electroporaron células en cubetas de 0.4-cm at 250 V y 975 PF y a continuación se resuspendieron en RPMI1640 con FBS al 10%. El nivel de CA-p24 en el sobrenadante de cultivo libre de célula se determinó por medio de ensayo de captura de antígeno por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (Back et al, 1996).

El experimento de evolución se inició con transfección de 15 µg de plásmido proviral de HIV-rtTA en 1.5 x 10⁷ células SupT1. Las células se partieron en 12 cultivos independientes y se adicionó dox (Sigma D-9891) para iniciar la replicación viral. Tres días después de la transfección, se retiró dox de los cultivos lavando las células dos veces con medio, cada vez seguida por una incubación de 30 min a 37°C y CO₂ al 5% para permitir el desprendimiento de dox de las células. A continuación se resuspendieron las células en medio y se cultivaron sin dox. Si la replicación de virus era aparente como se indica por la formación de sincitia, el sobrenadante de cultivo que contiene el virus se pasa a células SupT1 frescas. Se usaron muestras de célula infectada para analizar la secuencia proviral de rtTA.

Análisis de ADN proviral de secuencias evolucionadas. Células infectadas de HIV-rtTA se peletizaron mediante centrifugación y se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato. Se solubilizó ADN celular total resuspendiendo las células en Tris-HCl de 10 mM (pH 8.0)- EDTA de 1 mM - Tween 20 al 0.5%, seguido de incubación con 200 µg/ml de proteinasa K a 56°C por 60 min y 95°C por 10 min. Los genes rTA provirales se amplificaron PCR con primers tTA1 (5'-ACAGCCATAGCAGTAGCTGAG-3') y tTA-rev2 (5'-GATCAAGGATATCTTGCTTCGT-3'), y se secuenciaron con el kit secuenciador de ciclo terminador Bigdye (Applied Biosistemas).

Construcción de plásmidos de expresión rtTA novedosos y variantes de HIV-rtTA. El plásmido pCMV-rtTA contiene el gen rTA2s-S2 en el vector de expresión pUHD141-1/K (Urlinger et al, 2000). Para introducir la mutación P56S, el producto proviral PCR con esta mutación se digirió con XbaI y SmaI y se usó para reemplazar el fragmento correspondiente en pCMV-rtTA. Para generar variantes de rtTA con las mutaciones G19F y E37L y diferentes amino ácidos en posición 56, se realizó mutagenesis PCR sobre pCMV-rtTAG19F E37L (EJEMPLO 2) con el cebador (primer) sense ryom-rtTA-56 (5'- AAGCGGGCCCTGCTCGATGCCCTGNNKATCGAGATGCTGGACAGGC-3', donde K corresponde a G o a T, y N corresponde a G, A, T o C) más el primer antisense CMV2 (5'- TCACTGCATTCTAGTTGTGGT-3'). Se clonaron secuencias de rtTA mutante como fragmentos de Apal-BamHI a pCMV-rtTAG19F E37L. Se clonaron rTAs de secuencias novedosas en el vector lanzadera pBlue3'LTRext-deltaU3-rtTAF86Y A209T-2ΔtetO (Das et al, 2004a) usando los sitios XcmI y NdeI y se clonaron a continuación a el clon molecular HIV-rtTA como BamHI-BglII fragments. Todas las construcciones se verificaron mediante análisis de secuencia.

Ensayo de actividad rtTA. pLTR-2ΔtetO-luc expresa luciferasa de luciérnaga a partir del promotor LTR-2ΔtetO derivado del clon molecular HIV-rtTA (Marzio et al, 2001; Marzio et al, 2002). pCMV-7tetO-luc, llamado previamente pUHC13-3 (Gossen & Bujard, 1992), contiene siete elementos tetO localizados corriente arriba de un promotor mínimo CMV y el de luciferasa de luciérnaga. El plásmido pRL-CMV (Promega), en el que la expresión de luciferasa de renilla se controla por el promotor CMV, se usó como un control interno para permitir corrección por diferencias en eficiencia de transfección. Se derivan células de HeLa X1/6 de la línea celular de carcinoma cervical de HeLa cervix y copias integradas cromosómicamente harbor de la construcción reportera de luciferasa de luciérnaga CMV-7tetO (Baron et al, 1997). Se cultivaron células de carcinoma cervical HeLa X1/6 y C33A (ATCC HTB31) (Auersperg, 1964) a 37°C y CO₂ al 5% en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con FBS al 10%, amino ácidos no esenciales de medio esencial, penicilina de 100 unidades/ml, y estreptomycin de 100 μg/ml.

Se hicieron crecer células C33A y HeLa X1/6 en pozuelos de 2-cm² a una confluencia de 60% y se transfectaron mediante método de precipitación de fosfato de calcio. 1 μg de mezcla de ADN en 15 μl de agua se mezcló con 25 μl de HEPES de 50 mM (pH 7.1)- NaCl de 250 mM - Na₂HPO₄ de 1.5 mM y 10 μl de CaCl₂ de 0.6 M, se incubó a temperatura ambiente por 20 min y se adicionó al medio de cultivo. La mezcla de ADN consistió en 0.4 ng de pCMV-rtTA, 20 ng de pLTR-2ΔtetO-luc o pCMV-7tetO-luc, 0.5 ng de pRL-CMV, y 980 ng de pBluescript como ADN soporte para células C33A, o 8 ng de pCMV-rtTA, 2.5 ng de pRL-CMV, y 990 ng de pBluescript para células HeLa X1/6. Se cultivaron células transfectadas por 20 horas a diferentes concentraciones de dox, se lavaron con DMEM, y se cultivaron a continuación por 24 horas con medio fresco que contiene dox (las mismas concentraciones como antes del paso de lavado). Luego se lisaron las células en búfer Passive Lysis (Promega), y se determinaron actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla con el ensayo reportero de luciferasa dual (Promega) usando un luminómetro de microplaca GloMax (Promega). La expresión de luciferasa de luciérnaga y renilla estuvo dentro del rango lineal y no se observaron efectos de silenciamiento. La actividad de las variantes de rtTA se calculó como la relación de las actividades de luciferasa de luciérnaga y de renilla, y se corrigió para variación de sesión intermedia.

Resultados

Evolución de HIV-rtTA después de administración transitoria de dox. Para verificar la estabilidad genética de HIV-rtTA al remover el dox efector, iniciamos 12 cultivos de virus independientes en células T SupT1 con dox (Fig. 20B). La replicación viral resultó en la producción de CA-p24 y la aparición de sincitia en todos los cultivos. Al día 3, lavamos los cultivos para remover dox, lo que resultó en silenciamiento de replicación viral como era obvio de la disminución en niveles CA-p24 y la desaparición de sincitia en todos los cultivos. Sin embargo, los niveles CA-p24 comenzaron a incrementarse de nuevo los días 10-20, y el cultivo continuado resultó en niveles altos de CA-p24 y formación de sincitia grande. En el pico de infección, se hizo pasar el virus a células SupT1 fresco y se cultivó sin dox. Todos los virus fueron capaces de iniciar una infección de propagación, lo que indica que habían perdido control de dox. ADN celular total con provirus integrados se aisló de los cultivos y el gen de rtTA se amplificó PCR y se secuenció. En todos los cultivos, el virus había adquirido una mutación de punto (CCA a UCA) en el gen de rtTA que resultó en una sustitución de prolina a serina en posición 56 (P56S).

Se obtuvieron resultados similares con HIV-rtTA_{V9I G138D}, una variante de HIV-rtTA con dos mutaciones rtTA (V9I y G138D) (EJEMPLO 1). Los virus evolucionados iniciaron a replicar sin dox en 10 de los 12 cultivos (Fig. 20C). Nueve cultivos de virus habían adquirido la mutación de P56S, mientras que un cultivo había obtenido la mutación G19E previamente descrita (EJEMPLO 2). En los dos cultivos restantes, disminuyen establemente niveles de CA-p24 después de retirar dox y se observó replicación no viral después de cultivar prolongadamente. En el día 64, estos cultivos se partieron y continuaron con y sin dox. Mientras los cultivos sin dox permanecieron negativos para CA-p24, fueron evidentes las infecciones que se propagan en los cultivos con dox (Fig. 20C). Así, los virus en estos dos cultivos permanecieron dependientes de dox y pueden reactivarse fácilmente.

Mutación P56S causa un fenotipo parecido a tTA. La selección repetida de la mutación P56S en cultivos independientes, múltiples sugiere firmemente su ligazón a la pérdida observada de control de dox. Para demostrar

que esta sustitución de amino ácido es efectivamente responsable de un fenotipo rTA alterado, clonamos el gen rTA mutado P56S al plásmido de expresión pCMV-rTA y ensayamos su actividad en un sistema Tet-on regular. El plásmido de expresión rTA se transfeció a células C33A junto con un plásmido reportero en el que se controla la expresión de luciferasa mediante el promotor LTR-2ΔtetO viral (Marzio et al, 2001; Marzio et al, 2002). Se cultivaron células transfectadas por dos días a diferentes concentraciones de dox. Posteriormente determinamos el nivel de luciferasa intracelular, el cual refleja actividad de rTA (Fig. 21A). R_tTA de tipo silvestre no muestra actividad sin dox o con un bajo nivel de dox (10 ng/ml), y su actividad gradualmente se incrementa a concentraciones mayores de dox. En contraste, la variante P56S exhibe una muy alta actividad sin dox, y su actividad se inhibe en lugar de activarse incrementando concentraciones de dox. Este fenotipo es similar a aquel de del activador de transcripción tTA, que difiere de rTA por cuatro amino ácidos, que incluyen una alanina en lugar de prolina en posición 56 (Urlinger et al, 2000). La alta actividad de la variante P56S en la ausencia de dox explica su aparición en los experimentos de lavado de dox, mientras que su baja actividad con dox explica por qué nunca observamos esta mutación en cultivos de largo plazo de HIV-rTA en la presencia de dox.

También analizamos actividad de rTA en células transfectadas C33A con un reportero de luciferasa bajo el control de un promotor CMV mínimo acoplado a un arreglo de siete elementos tetO (Gossen & Bujard, 1992), y en células HeLa X1/6 que contienen copias integradas establemente de esta construcción de luciferasa CMV-7tetO (Baron et al, 1997). En ambos ensayos, observamos resultados similares que con la construcción de promotor viral LTR-2ΔtetO (Fig. 21B y 21C), lo que demuestra que el fenotipo similar a tTA de rTA_{P56S} no es dependiente del tipo de promotor, no en el estado episomal o cromosomal del gen reportero.

HIV-rTA_{G19F E37L} puede perder control de dox mediante una mutación P56S. Hemos construido previamente una variante de HIV-rTA con las mutaciones de cerrojo de seguridad G19F y E37L que evitan que el virus pierda control de dox durante cultivo de largo plazo con dox (EJEMPLO 2). Ahora ensayamos la estabilidad de HIV-rTA_{G19F E37L} en el experimento de lavado de dox. Este virus sí perdió control de dox en solo uno de los 12 cultivos, y todos los otros cultivos no mostraron ninguna replicación en la ausencia de dox (Fig. 20D). Análisis de secuencia reveló que la variante de escape había adquirido la mutación P56S. Este resultado demuestra que aunque HIV-rTA_{G19F E37L} mostró una tendencia más baja a perder control de dox que el virus original sin mutaciones de cerrojo de seguridad (Fig. 20B), la ruta de escape en posición 56 se bloquea preferiblemente para mejorar aún más la estabilidad genética del virus.

Mutación de cerrojo de seguridad en posición 56. La mutación P56S se causa por una sustitución de nucleótido individual (CCA a UCA). Tales transiciones de nucleótido individual (sustituciones pirimidina-pirimidina o purina-purina) ocurren con una frecuencia mucho más alta que las transversiones de nucleótido individuales (sustituciones pirimidina-purina) o cambios de nucleótido múltiples durante transcripción inversa de HIV-1 (Berkhout et al, 2001; Berkhout & de Ronde, 2004). Este sesgo mutacional influye firmemente el curso de evolución del virus (Keulen et al, 1996; Keulen et al, 1997). Por consiguiente, la ruta no deseada de evolución en posición 56 se bloquea introduciendo codones alternativos de amino ácido que requieren múltiples cambios de nucleótido para que HIV-rTA pierda control de dox. De hecho, hemos bloqueado exitosamente las rutas de escape en posiciones 19 y 37 mediante tales mutaciones de cerrojo de seguridad, que demuestran la efectividad de esta estrategia (EJEMPLO 2). Para bloquear todas las tres rutas de escape observadas de HIV-rTA al mismo tiempo, la mutación de cerrojo de seguridad de posición 56 se combina idealmente con las mutaciones de posiciones 19 y 37. Para identificar sustituciones adecuadas de amino ácido, hicimos plásmidos de expresión de rTA con todos los amino ácidos posibles en posición 56 en combinación con las mutaciones G19F y E37L, y se ensayó su actividad en células HeLa X1/6.

La actividad de estas 20 variantes de rTA varía considerablemente (Fig. 22A). Como la variante S, las variantes A, C y H exhiben un fenotipo similar a tTA, puesto que su actividad es relativamente alta en la ausencia de dox y baja con niveles crecientes de dox. Excepto por las variantes F y M que son completamente inactivas, las otras variantes exhiben un fenotipo de rTA, puesto que su actividad se incrementa con un nivel creciente de dox. Sin embargo, las actividades basal e inducida de estas variantes (a dox de 0 y 1000 ng/ml, respectivamente) difieren significativamente. Debido a que la variante L muestra un fenotipo rTA con una actividad basal muy baja, introdujimos esta variante a HIV-rTA y ensayamos replicación viral en células T SupT1. Este virus no replicaron sin dox, pero tampoco con dox (no se muestran los datos), lo que indica que la actividad inducida de la variante L (~0.3% de actividad rTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml) no es suficiente para replicación de HIV-rTA. Esto está en concordancia con nuestra observación de que rTA de tipo silvestre no soporta replicación viral a dox de 10 ng/ml (~0.4% de actividad de rTA; wt en Fig. 22A) y rTAG19F E37L no soporta replicación a dox de 100 ng/ml (~0.4% de actividad de rTA; P variante en Fig. 22A). Todos estos resultados indican que las variantes E, F, L y M con sus ambas actividades basal e inducida más bajas de 0.4% no soportará replicación viral. Por lo tanto coloreamos los codones que corresponden a estos amino ácidos y los codones stop en negro (Fig. 22B). La actividad basal de las variantes A, C, G, H, N, S, e Y es más alta que 0.4%. Puesto que los virus correspondientes HIV-rTA están en riesgo de replicar sin dox, sus codones son gris oscuro (pero no totalmente negros). Las otras variantes que muestran una actividad basal baja (<0.4%) y una alta actividad inducida (>0.4%) resultan en virus dependiente de dox, y sus codones son gris claro.

En la tabla de codón, cada cambio en la fila o la columna representa una sustitución de nucleótido individual. De manera obvia, el único codón de posición 56 que preserva dependencia de dox (gris claro) y requiere más de una mutación de nucleótido individual para convertirse en un codón que permite replicación sin dox (gris oscuro) es el codón AUA que codifica una isoleucina. Sin embargo, la actividad de la variante I a dox de 1000 ng/ml es sólo 1% del nivel de tipo silvestre (Fig. 22A), que puede resultar en un virus que replica mal. Las variantes K y Q, que muestran una actividad dependiente de dox similar a la variante P (rtTA_{G19F E37L}), requiere al menos una transversión de nucleótido para convertirse a una variante independiente de dox. Se ha mostrado que las transversiones ocurren menos frecuentemente que las transiciones durante la transcripción inversa de HIV-1 (Berkhout et al, 2001; Berkhout & de Ronde, 2004). Por ejemplo, nosotros sí observamos frecuentemente una mutación P56S (causada por una CCA a UCA), pero nunca una mutación P56A (requeriría una transversión CCA a GCA) en el experimento de lavado de dox, aunque ambas mutaciones causarían de manera similar una alta actividad en la ausencia de dox (Fig. 22A). Por lo tanto, la introducción de un codón AAG (K) o CAG (Q) en posición 56 de rtTA bloquea la aparición de variantes de virus independientes de dox al retirar dox.

Bloqueo de pérdida de control de dox mediante variante de rtTA de cerrojo de seguridad triple. Construimos clones moleculares de HIV-rtTA que llevan mutaciones de cerrojo de seguridad triple G19F, E37L y P56K o P56Q, y ensayamos su replicación en células T SupT1 con y sin dox (Fig. 23). Ambos virus replicaron de una manera dependiente de dox. Sin embargo, mientras que la replicación de HIVrtTAG19F E37L P56K fue tan eficiente como la variante de cerrojo de seguridad HIV-rtTA_{G19F E37L}, HIV-rtTA_{G19F E37L P56Q} replicó menos eficientemente. Por lo tanto nosotros enfocamos nuestros estudios en la variante de HIV-rtTA_{G19F E37L P56K} y ensayamos la estabilidad genética de este virus en cultivos de largo plazo con dox y en experimentos de lavado de dox. Comenzamos 24 cultivos de largo plazo con dox y ensayamos replicación de virus en la presencia y ausencia de dox en diferentes puntos de tiempo (como se describió previamente en el EJEMPLO 2). Todos los cultivos de virus quedaron completamente dependientes de dox durante los 100 días de cultivo, y el análisis de secuencia reveló que las mutaciones de cerrojo de seguridad se mantuvieron establemente en todos los cultivos (no se muestran datos). Para ensayar la estabilidad genética de HIVrtTAG19F E37L P56K después de administración transitoria de dox, iniciamos 24 cultivos de virus con dox (Fig. 24). La replicación de virus resultó en la producción de cantidades detectables de CA-p24 y la aparición de sincitia en todos los cultivos. Al retirar dox al día 3, el nivel CA-p24 bajó y desapareció la sincitia, y no pudo detectarse señal alguna de replicación viral en ninguno de los 24 cultivos en los meses siguientes. Al día 60, todos los cultivos se partieron y continuaron con y sin dox. Mientras no hubo replicación viral en los cultivos sin dox, la administración de dox dio lugar a infecciones que se propagan, que indican que el virus en todos los cultivos quedaron dependientes de dox, y los niveles de CA-p24 indetectables en cultivos sin dox no fueron debido a la pérdida de genomas provirales o al silenciamiento total del promotor viral. Así, la replicación de HIVrtTAG19F E37L P56K se queda dependiente de dox en ambos cultivos de largo plazo con dox y los cultivos activados transitoriamente, lo que demuestra que las mutaciones de triple cerrojo de seguridad en posiciones 19, 37 y 56 de rtTA bloquean completamente la pérdida de dox.

Conclusiones

Nuestros experimentos de evolución de virus demuestran que HIV-rtTA está en riesgo de escapar de control de dox por una sustitución de amino ácido en rtTA en posición 19, 37 o 56. Para generar un virus HIV-rtTA seguro, todas las tres rutas de evolución se bloquean preferiblemente. Hemos bloqueado previamente las rutas de posición 19 y 37 por mutaciones de cerrojo de seguridad (por ejemplo G19F y E37L) que requieren múltiples cambios de nucleótido para perder control de dox (EJEMPLO 2). Aquí demostramos que la ruta de escape de posición 56 se bloquea eficientemente por la introducción de un amino ácido alternativo en posición 56 (por ejemplo, P56K or P56Q) que requiere al menos una transversión de nucleótido para convertir rtTA en una variante independiente de dox.

Tabla 1: Variantes rtTA evolucionadas y construidas naturalmente

rtTA	Mutaciones	Veces en cultivo	Variación natural en TetR							
			A	B	C	D	E	G	H	
Tipo silvestre ^a	-	-								
V1	F86Y A209T ^b	-	F	F	F	F	F	F	F	F
V2	V9I	2	V	V	V	V	V	V	V	V

(continuación)

rtTA	Mutaciones	Veces en cultivo	Variación natural en TetR							
			A	B	C	D	E	G	H	
Tipo silvestre ^a	-	-								
V3	F67S	2	S	F	S	S	S	S	S	V
V4	G138D	7	S	G	S	S	S	S	S	A
V5	E157K	2	E	E	E	D	E	E	E	E
V6	R171K	1	R	R	Q	R	Q	H	T	
V7	V9I G138D	1					-			
V8	V9I E157K	1					-			
V9	V9I R171K	1					-			
V10	F67S R171K	1					-			
V11	V9I F67S	-					-			
V12	F67S G138D	-					-			
V13	F67S E157K	-					-			
V14	V9I F67S G138D	-					-			
V15	V9I F67S E157K	-					-			
V16	V9I F67S R171K	-					-			
V17	V9I G138D E157K	-					-			
V18	V9I G138D R171K	-					-			

^a El rtTA de tipo silvestre se describió previamente como rtTA2s-S2 (Urlinger et al. 2000).

^b Todas las variantes (V1-V18) contienen las mutaciones F86Y (en el dominio TetR) y A209T (en el dominio de activación VP16).

Descripción breve de los dibujos

- 5 **Figura 1. Mutación del gen rtTA por evolución viral.** (A) En el virus HIV-rtTA, el eje Tat-TAR axis de regulación de transcripción ha sido desactivado mediante mutación de ambos Tat y TAR (cajas cruzadas). La transcripción y la replicación del virus se hicieron dependientes de dox por introducción de elementos tetO en la región de promotora de LTR y reemplaza el gen nef por el gen rtTA. Esta proteína de amino ácido 248 es una fusión del represor Tet E. coli (TetR) y el dominio de activación (AD) VP16 del virus herpes simplex. La parte TetR puede subdividirse en un dominio enlazante (BD) de ADN (α -hélices 1-3) y un dominio de núcleo regulatorio (α -hélices 5-10) con una superficie de dimerización (α -hélices 7-10). Las mutaciones F86Y (triángulo gris oscuro) y A209T (triángulos negros) estuvieron presentes en el virus iniciante y se mantiene en todos cultivos de largo plazo. Triángulos grises claros indican intercambios de amino ácido adicionales en rtTA que se observaron en cultivos independientes, múltiples de HIV-rtTA^{-F86Y A209T}. (B) La estructura cristalina del homodímero TetR (un monómero en gris oscuro, el otro en gris claro) acomplejado con Tc (gris claro) y Mg²⁺ (bola gris) (Hinrichs et al, 1994; Kisker et al, 1995). El residuo 86 se
- 10
- 15

muestra en gris oscuro. Amino ácidos mutados adicionales (posiciones 9, 67, 138, y 171) se muestran en gris oscuro. No se muestra el residuo 157 porque el segmento 156 a 164 es flexible y no se determina en la estructura cristalina de TetR. A la derecha se muestra un acercamiento de la región enlazante de Tc. Hay siete clases de proteínas TetR (A-E, G, H) con una secuencia altamente conservada. La estructura cristalina de alta resolución que se muestra se basa en la clase D (TetR^D). rTA se basa en la clase B (TetR^B), que comparte 63% de identidad de secuencia con TetR^D. La estructura cristalina de TetR^B a resolución media reveló un pliegue de polipéptido idéntico (Hinrichs et al, 1994). Por lo tanto, podemos asumir que las interacciones de TetR con Tc y Mg²⁺ serán casi idénticas en ambas clases. Las figuras se dibujan usando las coordenadas 2TCT de los programas Protein Data Bank y el MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) y RASTER3D (Merritt et al, 1997).

Figura 2. Variantes de rTA novedosas muestran actividad incrementada y sensibilidad a dox en diferentes sistemas Tet. La actividad de transcripción de variantes de rTA se midió en células C33A transfectadas con un plásmido que lleva el gen reportero de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor viral LTR-2ΔtetO (LTR-2ΔtetO; A) o bajo el control de un promotor mínimo privado de CMV acoplado a siete elementos tetO (CMV-7tetO; B). Además, se midió la actividad rTA en células HeLa X1/6 (Baron et al, 1997) que contienen una copia integrada cromosómicamente de la construcción reportera CMV-7tetO (CMV-7tetO-integrado; C, D). Variantes V1 a V10 se compararon en todos los tres sistemas Tet (paneles A-C) y variantes V11 a V18 en las células con el reportero integrado (panel D). Se transfectaron células con el plásmido de expresión rTA indicada o pBluescript como un control negativo, y un plásmido que expresa de manera constitutiva luciferasa de renilla para corregir por diferencias en eficiencia de transfección. Se cultivaron células en la presencia de diferentes concentraciones de dox (0-1000 ng/ml). La proporción de las actividades de luciferasa y renilla medidas 2 días después de transfección refleja la actividad de rTA. Todos los valores se relacionaron con la actividad de rTA de tipo silvestre (wt) a dox de 1000 ng/ml, que se estableció arbitrariamente a 100%. En (C y D), se muestran valores promedio de tres transfecciones, con barras de error que indican la desviación estándar.

Figura 3. Actividad de transcripción y sensibilidad a dox de las variantes de rTA evolucionadas y construidas naturalmente

Se efectuaron ensayos de transfección en células HeLa X1/6, véase Fig. 2 para los detalles. La actividad de transcripción observada a dox de 1000 ng/ml se muestra como valor promedio de tres transfecciones con barras de error que indican la desviación estándar. La actividad de rTA de se estableció al 100%. La sensibilidad a dox se compara con rTA de tipo silvestre cuya sensibilidad se establece arbitrariamente en 1. Para cada variante rTA, la concentración de dox (ng/ml) que da lugar a una actividad comparable con la de la actividad de rTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml se indica en paréntesis. (nd, no determinada)

Figure 4. Mutaciones no afectan el nivel de protein rTA intracelular. Se transfectaron células HeLa X1/6 con el plásmido de expresión rTA indicado (carriles 3 a 6) o pBluescript como un control negativo (carril 2). Se prepararon extractos celulares totales en 2 días después de transfección y se analizó en Western blot que se había teñido con suero de conejo anti-TetR policlonal (Krueger et al, 2003). Se muestra la detección de proteína TetR purificada (2ng) en el carril 1. Se indican la posición y el peso molecular (en kDa) de las proteínas rTA y TetR.

Figure 5. Variantes rTA novedosas pueden activarse por compuestos similares a dox. Se midió la actividad de rTA en células HeLa X1/6, véase Fig. 2 para los detalles. Se cultivaron células en la presencia de diferentes concentraciones de Tc o Mc (0-10000 ng/ml). La actividad rTA de tipo silvestre (wt) a dox de 1000 ng/ml (no se muestra) se estableció en 100%. Los valores promedio de las tres ttransfecciones se trazan con barras de error que indican la desviación estándar.

Figura 6. Las variante de rTA mejoran replicación de HIV-rTA. Las variantes de rTA V7 y V14 se clonaron al genoma proviral HIVrTA. Se transfectaron células SupT1 con 5 μg de los clones moleculares y se cultivaron en la presencia de diferentes concentraciones de dox (0-1000 ng/ml). Se moniotreó la replicación de virus mediante CA-p24 ELISA en muestras de sobrenadante de cultivo.

Figura 7. Se indujo replicación de HIV-rTA mediante compuestos similares a dox. Se transfectaron células SupT1 con 5 μg de los clones HIV-rTA y se cultivó en la presencia de Tc o Mc de 500 ng/ml. Se monitoreó la replicación de virus mediante CA-p24 ELISA en muestras de sobrenadante de cultivo.

Figura 8. Evolución de HIV-rTA puede resultar en pérdida de control de dox. (A) Esquema del genoma de HIV-rTA. Se indican los elementos Tat-TAR desactivados (cajas cruzadas) y los elementos rTA-tetO introducidos. rTA es una proteína de fusión del repressor Tet de E. coli (TetR) y el dominio de activación (AD) VP16 de virus herpes simplex. TetR contiene un dominio que enlaza ADN (DNA BD) (residuos 1-44) y un dominio de núcleo regulatorio (residuos 75-207) con una superficie de dimerización. (B) Diagrama de flujo del experimento de evolución de 24 pozuelos. Se proporcionan más detalles en el texto. (C) Pérdida gradual de control de dox en HIV-rTA, HIV-rTA 2ΔtetO (que llevan la configuración de promotor 2ΔtetO mejorada) (Marzio et al. 2001; Marzio et al. 2002) y HIV-rTA_{F86Y A209T} (que lleva el promotor LTR-2ΔtetO y el gen rTA_{F86Y A209T} mejorado) (Das et al. 2004a). La variante WV-

rtTA_{AG19F E37L} desarrollada en este estudio no escapa del control de dox. Se trazó el número de cultivos dependientes de dox como una función del tiempo de cultivo. Cada experimento se inició con 24 cultivos independientes. (D) Sustituciones de amino ácido observadas en cultivos HIV-rtTA que perdieron control de dox. En todos los casos, la sustitución G19E resultó de una mutación de codón GGA a GAA y la sustitución E37K de una mutación de GAG a AAG.

Figura 9. Replicación de variantes HIV-rtTA evolucionadas. La replicación del virus HIV-rtTA original, el virus del cultivo C6 o del cultivo C5 (ambos cosechados después de 50 días de cultivar) se comparó infectando células SupT1 T con cantidades iguales de virus (CA-p24 de 5 ng/ml) en la ausencia o presencia de dox (1 µg/ml). El análisis de secuencia reveló que el virus C6 llevaba las mutaciones G19E y E156K en el gen rtTA, y el virus C5 llevaba la mutación E37K (Fig. 1D).

Figura 10. Sustituciones de amino ácido en posición rtTA 19 o 37 confieren la pérdida de control de dox. Los rtTAs de secuencia mutada G19E y E37K se clonaron en el genoma proviral HIV-rtTA 2ΔtetO (Marzio et al, 2001; Marzio et al, 2002). Se transfectaron células SupT1 con 2.5 µg de los clones moleculares y se cultivaron en la presencia de dox de 0-1000 ng/ml. La replicación de virus se monitoreó mediante CA-p24 ELISA en muestras de sobrenadante de cultivo.

Figura 11. Replicación de variantes HIV-rtTA con amino ácidos alternativos en posición 37. Se transfectaron células SupT1 con plásmidos provirales HIV-rtTA 2ΔtetO (2.5 µg) que llevan el tipo silvestre (E) o un amino ácido alternativo (K, D, L, N, F, Q, R, S) en posición 37 de rtTA, y se cultivó con o sin dox de 1 µg/ml. Todos los virus, excepto por el mutante E37K tienen el codón G alternativo (GGU en lugar de GGA) en posición 19 de rtTA, que no afecta la replicación viral (no se muestran datos), y las mutaciones F86Y y A209T (Das et al. 2004a).

Figura 12. Actividad de transcripción de variantes de rtTA con amino ácidos alternativos en posición 19 o 37. (A y B) se midió actividad de rtTA en células HeLa X1/6 (Baron et al. 1997) que contienen copias integradas establemente de la construcción reportera de luciferasa de luciérnaga CMV-7tetO (Gossen et al. 1992). Se transfectaron células con el plásmido de expresión de rtTA indicado (todas las variantes de rtTA contienen las mutaciones F86Y y A209T que mejoran la actividad rtTA (Das et al. 2004a) o pBluescript como un control negativo (-), y un plásmido que expresa de manera constitutiva luciferasa de renilla para corregir por diferencia en la eficiencia de transfección. Se cultivaron células en la presencia de diferentes concentraciones de dox (0-1000 ng/ml). La proporción de actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla medida dos días después de la transfección refleja actividad rtTA. Todos los valores se relacionaron con la actividad de rtTA tipo silvestre (37E en A, y 19G en B) a dox de 1000 ng/ml que se estableció arbitrariamente en 100%. Se graficaron los valores promedio de dos transfecciones con la barra de error que indica la desviación estándar. (C y D) Tablas de codón de variantes rtTA con todos los amino ácidos posibles en la posición 19 o 37. El fenotipo dependiente de dox se marca en gris claro, las variantes activas en la ausencia de dox en gris oscuro, y las variantes inactivas en negro. Véase el texto para los detalles.

Figura 13. La actividad de la variante rtTA novedosa con mutaciones de cerrojo de seguridad. (A) La actividad de rtTA de tipo silvestre y de cerrojo de seguridad (G19F E37L) fue medida en células HeLa X1/6, véase Fig. 5 para los detalles. Se cultivaron células en la presencia de diferentes concentraciones de dox (0-1000 ng/ml). Todos los valores se relacionaron a la actividad de rtTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml, que se estableció arbitrariamente en 100%. Se graficaron valores promedio de dos transfecciones con la barra de error que indica la desviación estándar. (B y C) Replicación de HIV-rtTA_{F88Y A209T} y HIV-rtTA_{AG19F F37L} (que también lleva las mutaciones F86Y y A209T) (Das et al. 2004a). Se transfectaron células SupT1 con 5 µg de los clones moleculares y se cultivaron con o sin dox de 1 µg/ml. La replicación de virus se monitoreó mediante CA-p24 ELISA en muestras de sobrenadante de cultivo.

Figura 14 A+B. Actividad de transcripción y sensibilidad a dox de variantes rtTA de tipo silvestre, construido y evolucionado naturalmente. Ensayos de transfección se realizaron en células HeLa X1/6, véase Fig. 2 para los detalles. Se muestra la actividad de transcripción observada a dox de 1000 ng/ml como valor promedio de tres transfecciones con barras de error que indican la desviación estándar. La actividad rtTA de tipo silvestre se estableció en 100%. La sensibilidad a dox se compara con el rtTA de tipo silvestre cuya sensibilidad se establece arbitrariamente en 1. Para cada variante de rtTA, la concentración de dox (ng/ml) que resulta en una actividad comparable a la actividad de rtTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml se indica entre paréntesis (parte de estos resultados también se muestra en figura 3).

Figura 14C. Variantes de rtTA de acuerdo con la presente invención. Cada fila columna representa variantes adecuadas de rtTA.

Figura 15. Variantes rtTA novedosas pueden activarse mediante compuestos similares a dox. La actividad de rtTA se midió en células HeLa X1/6, véase figura. 2 para los detalles. Se cultivaron células en la presencia de

concentraciones diferentes de Tc o Mc (0-10000 ng/ml). La actividad rTA de tipo silvestre (wt) a dox 1000 ng/ml (no se muestra) se estableció en 100%.

Figura 16. Transactivadores a base de TetR. (A y B) En rTA homodimérico, cada monómero contiene un dominio TetR derivado de *E. coli* N-terminal y un dominio de activación derivado de VP-16 de virus herpes simplex C-terminal. Las mutaciones V9I, F67S, F86Y y G138D que aumentan la actividad de rTA están todas localizadas en el dominio TetR. sc rTA es una versión de cadena individual de rTA. Contiene dos dominios de TetR conectados cabeza con cola mediante un enlazador peptídico y un dominio de activación individual en el extremo de C-terminal.

Figura 17. Mutaciones que aumentan actividad de rTA no mejoran actividad de tTA. La actividad de transcripción de variantes de tTA se midió en células HeLa X1/6 (Baron et al, 1997) que contienen copias integradas cromosómicamente de la construcción reportera de luciferasa CMV-7tetO. Se transfectaron células con los plásmidos de expresión tTA indicados o pBluescript (-) como un control negativo y un plásmido que expresa de manera constitutiva luciferasa de renilla para corregir para diferencias en eficiencia de transfección. Se cultivaron células en la presencia de diferentes concentraciones de dox (0-20 ng/ml). La relación de las actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla medidas dos días después de transfección refleja la actividad de tTA. Todos los valores se relacionaron a la actividad de tTA original (tipo silvestre) en la ausencia de dox, que se estableció arbitrariamente en 100%. Se muestran valores promedio de dos transfecciones con la barra de error que indica la desviación estándar.

Figura 18. Mutaciones observadas en rTA pueden mejorar actividad de sc rTA. La actividad de transcripción de rTA y sc rTA se midió en células HeLa X1/6, véase figura. 17 para los detalles. Se cultivaron células en la presencia de diferentes concentraciones de dox (0-1000 ng/ml). Todos los valores se relacionaron a la actividad de sc rTA original (tipo silvestre) a dox de 1000 ng/ml, que se estableció arbitrariamente en 100%. Se graficaron valores promedio de dos transfecciones con la barra de error que indica la desviación estándar.

Figura 19. Nucleótidos y secuencia de amino ácido de rTA. Se muestra la secuencia de nucleótidos (línea superior) y la secuencia de amino ácido (línea inferior) de la variante rTA2^S-S2 (Urlinger et al, 2000).

Figura 20. Evolución de HIV-rTA después de administración transitoria de dox. (A) Esquema del genoma de HIV-rTA. Se indican los elementos de Tat-TAR inactivos (cajas cruzadas) y los elementos rTA-tetO introducidos. rTA es una proteína de fusión del represor Tet de *E. coli* (TetR) y el dominio de activación VP16 (AD) de virus herpes simplex. TetR contiene un dominio enlazante de ADN (DNA BD) (amino ácidos 1-44) y un dominio de núcleo regulatorio (amino ácidos 75-207) con una superficie de dimerización. (B-D) Pérdida de control dox en cultivos de HIV-rTA después de activación transitoria. Se transfectaron células SupT1 con HIV-rTA y se cultivaron a dox de 100 ng/ml (B), HIV-rTA_{V9I G138D} a dox de 10 ng/ml (C), o HIVrT_{AG19F E37L} a dox de 1000 ng/ml (D). Cada experimento se inició con 12 cultivos independientes (símbolos diferentes representan cultivos diferentes). Al día 3, se lavó dox y los cultivos continuaron con medio libre de dox. Los cultivos en los que el virus no perdió control de dox se partieron en dos partes al día 64 (C) o al día 66 (D) y se adicionó dox a una de las muestras. Se monitoreó la producción de virus por medio de CA-p24 ELISA en muestras de sobrenadante de cultivo.

Figura 21. La mutación P56S causa un fenotipo similar a tTA. The actividad de rTA de tipo silvestre y mutada P56S se midió en células C33A transfectadas con un plásmido reportero que lleva el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor LTR-2ΔtetO viral (LTR-2ΔtetO; A) o bajo el control de un promotor CMV mínimo acoplado a un arreglo de siete elementos tetO (CMV-7tetO; B). Además, la actividad de rTA se midió en células HeLa X1/6 (Baron et al, 1997) que contienen copias cromosómicamente integradas de la construcción de luciferasa CMV-7tetO (integrada a CMV-7tetO; C). Se transfectaron células con el plásmido de expresión rTA indicado (ambas variantes de rTA llevan las mutaciones F86Y y A209T (Das et al, 2004a) o pBluescript como un control negativo (-), y un plásmido que expresa renilla de manera constitutiva para corregir por diferencias en la eficiencia de transfección. Se cultivaron células con diferentes concentraciones de dox (0-1000 ng/ml). La proporción de las actividades de luciferasa de luciérnaga y renilla medidas dos días después de la transfección refleja la actividad de rTA. Todos los valores se relacionaron a la actividad de rTA de tipo silvestre a dox de 1000 ng/ml, que se estableció arbitrariamente a 100%.

Figura 22. Actividad de variantes rTA_{G19F E37L} con todos los amino ácidos posibles en posición 56. (A) La actividad de rTA se midió en células HeLa X1/6, véase figura 21 para los detalles. Todas las variantes llevan las mutaciones G19F, E37L, F86Y y A209T en combinación con diferentes amino ácidos en posición 56. El rTA de tipo silvestre (wt) que lleva solo las mutaciones F86Y y A209T se incluyó como un control cuya actividad a dox de 1000 ng/ml se estableció arbitrariamente en 100%. Se muestran valores promedio de dos transfecciones con la barra de error que indica la desviación estándar. (B) Tabla de codón de variantes rTA_{G19F E37L} con todos los amino ácidos posibles en posición 56. Los codones correspondientes de variantes inactivas se marcan en negro, de variantes dependientes de dox en gris claro, y de variantes que son activas sin dox en gris oscuro. Véase el texto para los detalles.

Figura 23. Replicación de variantes de HIV-rtTA_{G19F E37L} con amino ácidos diferentes en posición 56. Se transfectaron células SupT1 con 5 µg de clones moleculares de HIV-rtTA que codifican diferentes alelos de rtTA, y se cultivaron con o sin dox de 1 µg/ml. Todas las variantes rtTA contienen las mutaciones F86Y y A209T. La replicación de virus se monitoreó mediante CA-p24 ELISA en muestras de sobrenadante de cultivo.

5 **Figura 24. Bloqueo de pérdida de control de dox mediante mutaciones de triple cerrojo de seguridad.** Células SupT1 se transfectaron con HIV-rtTA que contienen mutaciones de triple cerrojo de seguridad (HIV-rtTA_{AG19 FE37L P56K}) a dox de 1000 ng/ml y se partieron en 24 cultivos independientes (símbolos diferentes representan cultivos diferentes). Al día 3 se lavó dox y se continuaron los cultivos con medio libre de dox. Al día 60, todos los cultivos se partieron en dos partes y se adicionó dox (1000 ng/ml) a una de las muestras. Se monitoreó producción de virus
10 mediante CA-p24 ELISA en muestras de sobrenadante de cultivo.

Referencias

- Akagi K, Kanai M, Saya H, Kozu T, Berns A. A novel tetracycline-dependent transactivador with E2F4 of transcripción activation domain (Un transactivador dependiente de tetraciclina con E2F4 de dominio de activación de transcripción. *Nucleic Acids Res.* 2001 Feb 15;29(4):E23
- 15 Auersperg, N. (1964). Long-term cultivation de hypodiploid human tumor células (Cultivo de largo plazo de células tumorales humanas hipodiploides). *J. Natl. Cancer Inst.* 32: 135-163.
- Back, N. K., M. Nijhuis, W. Keulen, C. A. Boucher, B. O. Oude Essink, A. B. van Kuilenburg, A. H. van Gennip, y B. Berkhout. 1996. Reduced replication de 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cell due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme (Replicación reducida de variantes de HIV-1 resistentes a 3TC. En célula primaria debido a defecto de procesividad de la enzima de transcriptasa inversa) *EMBO J.* 15:4040-4049.
- 20 Baron, U., Gossen, M., y Bujard, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivadores with graded transactivation potential (Transcripción controlada por tetraciclina en eucariotas: transactivadores novedosos con transactivación potencial). *Nucleic acids Res.* 25: 2723-2729.
- Baron, U., Schnappinger, D., Helbl, V., Gossen, M., Hillen, W., y Bujard, H. (1999). Generation de conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expresión of two genes (Generación de mutantes condicionales en eucariotas superiores alternando entre la expresión de dos genes). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1013-1018.
- 25 Baron, U., y Bujard, H. (2000). Tet represor-based system for regulated gene expresión in eukaryotic cells: principles and advances (Sistema a base de represor Tet para expresión génica regulada en células eucariotas: principios y avances). *Method Enzymol.* 327: 401-421.
- 30 Berens, C., y Hillen, W. (2003). Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes (Regulación génica por tetraciclina. Restricciones de regulación de resistencia en TetR forma de bacteria para aplicación en eucariotas. *Eur. J. Biochem.* 270: 3109-3121.
- Berkhout B, Das AT, Beerens N (2001) HIV-1 RNA editing, hypermutación, and error-prone reverse transcription. (Editar ARN de VIH-1, hipermutación y transcripción inversa susceptible a error), *Science* 292: 7.
- 35 Berkhout B y de Ronde A (2004) APOBEC3G versus reverse transcriptase in the generation de HIV-1 drugresistance mutations (APOBEC3G versus transcriptasa inversa en la generación de mutaciones de resistencia a la droga de VIH-1). *AIDS* 18: 1861-1863.
- Das, A. T., Klaver, B., Klasens, B. I., van Wamel, J. L., y Berkhout, B. (1997). A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is esencial for replication (Un motivo horquilla conservado en la región R-U5 del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 genoma ARN es esencial para replicación). *J. Virol.* 71: 2346-2356
- 40 Das, A. T., Klaver, B., y Berkhout, B. (1999). A hairpin structure in the R region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is instrumental in polyadenilation site selection Una estructura de horquilla en la región R del virus de inmunodeficiencia tipo 1 genoma ARN) . *J. Virol.* 73: 81-91
- 45 Das, A. T., et al. (2004a). Viral evolution as a tool to improve the tetracycline-regulated gene expression system (Evolución viral como una herramienta para mejorar el sistema de expresión génica regulada por tetraciclina). *J. Biol. Chem.* 279: 18776-18782.

- Das, A. T., Verhoef, K., y Berkhout, B. (2004b). A conditionally replicating virus as a novel approach toward an HIV vaccination (Un virus replicante condicionalmente como un enfoque novedoso hacia una vacunación de VIH). *Methods Enzymol.* 388: 359-379.
- 5 Deuschle, U., W. K. Meyer, y H. J. Thiesen. 1995. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters (Silenciamiento, reversible con tetraciclina, de promotores eucariotas). *Mol Cell Biol* 15:1907-1914.
- Forster, K., V. Helbl, T. Lederer, S. Urlinger, N. Wittenburg, y W. Hillen. 1999. Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells (Sistemas de expresión inducibles con tetraciclina que tienen actividad basal reducida en células de mamífero). *Nucleic acids Res.* 27:708-710.
- 10 Freundlieb, S., C. Schirra-Muller, y H. Bujard. 1999. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J. Gene Med.* 1:4-12. Gossen, M., y Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters (Control ajustado de expresión génica en células de mamíferos por promotores sensibles a tetraciclina). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551.
- 15 Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., y Bujard, H. (1995). Of transcription activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-1769.
- Gossen, M., y Bujard, H. (2001). Tetracyclines in the control of gene expression in eukaryotes. In *Tetracyclines in biology, chemistry y medicine (Tetraciclinas en el control de expresión génica en eucariotas. Tetraciclinas en biología, química y medicina)* (M. Nelson, W. Hillen, y R. A. Greenwald, Eds.), pp. 139-157. Birkhäuser Verlag, Basel.
- 20 Helbl, V. y W. Hillen. 1998. Stepwise selection of TetR variants recognizing tet operator 4C with high affinity and specificity (Selección a pasos de operador tet 4C que reconoce variantes TetR con alta afinidad y especificidad) . *J. Mol. Biol.* 276:313-318.
- Helbl, V., B. Tielbe, y W. Hillen. 1998. Stepwise selection of TetR variants recognizing tet operator 6C with high affinity and specificity (Selección por pasos de operador de tet 6C que reconoce variantes TetR). *J. Mol. Biol.* 276:319-324.
- 25 Henssler, E. M., O. Scholz, S. Lochner, P. Gmeiner, y W. Hillen. 2004. Structure-based design de Tet represor to optimize a new inducer specificity (Diseño a base de estructura de represor Tet para optimizar una nueva especificidad de inductor). *Biochemistry* 43:9512-9518.
- 30 Hinrichs, W., et al. (1994). Structure de the Tet represor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance (Estructura del complejo de tetraciclina-represeor Tet y regulación de resistencia a antibiótico). *Science* 264: 418-420.
- Kamper MR, Gohla G, Schluter G. A novel positive tetracycline-dependent transactivador (rtTA) variant with reduced background and enhanced activation potential (Una nueva variante positiva novedosa de nuevo transactivador dependiente de tetraciclina (rtTA) con actividad de fondo reducida y potencial de activación aumentada). *FEBS Lett.* 2002 Apr 24;517(1-3):115-20
- 35 Keulen W, Back NK, van Wijk A, Boucher CA, Berkhout B (1997) Initial appearance of the 184Ile variant in lamivudine treated patients is caused by the mutational bias of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (Aparición inicial de la variante 184Ile en pacientes tratados con lamivudine es causada por el sesgo mutacional de virus de inmunodeficiencia humana. *J Virol* 71: 3346-3350.
- 40 Keulen W, Boucher C, Berkhout B (1996) Nucleotide substitution patterns can predict the requirements for drugresistance of HIV-1 proteins (Patrones de sustitución de nucleótido pueden predecir los requerimientos para resistencia a droga de proteínas de VIH-1). *Antiviral Res* 31: 45-57.
- Kisker, C., Hinrichs, W., Tovar, K, Hillen, W., y Saenger, W. (1996). The complex formed between Tet represor and tetracycline-Mg²⁺ reveals mechanism of antibiotic resistance (El complejo formado entre represor Tet y tetraciclina-Mg²⁺ revela mecanismo de resistencia biológica). *J. Mol. Biol.* 247: 260-280
- 45 Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures (MOLSCRIPT: un programa para producir gráficos de estructuras de proteína tanto detallados como esquemático). *J. Appl. Crystallogr.* 24: 946-950

- Krueger, C., Berens, C., Schmidt, A., Schnappinger, D., y Hillen, W. (2003). Single-chain Tet transregulators. (Transreguladores Tet de cadena individual). *Nucleic Acids Research* Vol. 31 No. 12: 3050-3056.
- 5 Krueger, C., A. Schmidt, C. Danke, W. Hillen, y C. Berens. 2004. Transactivador mutants with altered effector specificity allow selective regulation of two genes by tetracycline variants (Mutantes transactivadores con especificidad de efector alterada permiten regulación selectiva de dos genes por parte de variantes de tetraciclina). *Gene* 331:125-131.
- Marzio, G., Verhoef, K., Vink, M., y Berkhout, B. (2001). In vitro evolution of a highly replicating, doxycycline-dependent HIV for applications in vaccine studies (Evolución in vitro de VIH altamente replicante, dependiente de doxiciclina para aplicaciones en estudios de vacuna). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6342-6347.
- 10 Marzio, G., M. Vink, K. Verhoef, A. de Ronde, y B. Berkhout. 2002. Efficient human immunodeficiency virus replication requires a fine-tuned level of transcription (Replicación eficiente de virus de inmunodeficiencia humana requiere un nivel finamente ajustado de transcripción). *J. Virol.* 76:3084-3088.
- Merritt, E. A., y Bacon, D. J. (1997). Raster3D: Photorealistic molecular graphics (Raster3D: Graficos moleculares fotoreales). *Methods Enzymol.* 277: 505-524
- 15 Mikaelian, I., y Sergeant, A. (1992). A general and fast method to generate multiple site directed mutations. *Nucleic acids Res.* 20: 376
- Peden, K., M. Emerman, y L. Montagnier. 1991. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones de HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI (Cambios en propiedades de crecimiento en el paso en cultivo de tejido de virus derivados de clones moleculares de HIV-1LAI, HIV-1MAL, y HIV-1ELI). *Virology* 185:661-672.
- 20 Scholz, O., M. Kostner, M. Reich, S. Gastiger, y W. Hillen. 2003. Teaching TetR to recognize a new inducer. *J. Mol. Biol.* 329:217-227.
- Smith, S. D., Shatsky, M., Cohen, P. S., Warnke, R., Link, M. P., y Glader, B. E. (1984). Monoclonal antibody y enzymatic profiles of human malignant T-lymphoid cells and derived cell lines (Perfiles de anticuerpo monoclonal y enzimáticos de células y líneas de célula derivadas. *Cancer Res.* 44: 5657-5660.
- 25 Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., y Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent of transcription activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity (Exploración de espacio de secuencia para dependencia de tetraciclina de activadores de transcripción: rango expandido de rendimiento y sensibilidad de mutaciones novedosas) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(14): 7963-7968.
- 30 Verhoet K., G. Marzio, W. Hillen, H. Bujard, y B. Berkhout. 2001. Strict control de human immunodeficiency virus type 1 replication by a genetic switch: Tet for Tat (Control estricto de replicación de virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante un intercambio genético: Tet por Tat. *J. Virol.* 75:979-987.

REIVINDICACIONES

1. Un método para expresar de manera inducible una secuencia de ácido nucleico de interés, que comprende:

- proporcionar una construcción de ácido nucleico que comprende dicha secuencia de ácido nucleico de interés enlazada de manera operacional a un sistema de expresión génica inducible que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica transactivador controlado por tetraciclina inversa (rtTA) y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual, dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende una mutación en un codón en posición 67 de amino ácido rtTA;

- introducir dicha construcción de ácido nucleico a un adecuado sistema de expresión; y

- permitir expresión inducible de dicha secuencia de ácido nucleico de interés.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende además un codón en posición 19 de amino ácido de rtTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato, y/o un codón en posición 37 de rtTA que difiere en al menos dos nucleótidos de una alanina, una lisina o un codón de serina, y/o una glutamina o codón de lisina en posición 56 de amino ácido rtTA.

3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende además un codón de glicina en posición 19 de amino ácido rtTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato.

4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende además un codón de alanina, cisteína, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparagina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina en posición 19 de amino ácido rtTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato.

5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende además un codón de histidina, de leucina o de arginina en posición 37 de amino ácido de rtTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina.

6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende además un codón en posición 9 de amino ácido rtTA que codifica isoleucina, y/o un codón en posición 19 de amino ácido rtTA que codifica alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina, y/o a codón en posición 37 de amino ácido rtTA que codifica cisteína, metionina, glutamina, treonina, histidina, leucina o arginina, y/o un codón en posición 56 de amino ácido rtTA que codifica lisina o glutamina, y/o un codón en posición 67 de amino ácido rtTA que codifica serina, y/o un codón en posición 68 de amino ácido rtTA que codifica arginina, y/o un codón en posición 86 de amino ácido rtTA que codifica tirosina, y/o a codón en posición 138 amino ácido rtTA que codifica aspartato o serina, y/o un codón en posición 157 de amino ácido rtTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 171 de amino ácido rtTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 177 de amino ácido rtTA que codifica leucina, y/o un codón en posición 195 amino ácido rtTA que codifica serina, y/o un codón en posición 209 de amino ácido rtTA que codifica treonina.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende F67S F86Y, F67S V9I F86Y, F67S V9I G19M G138D F86Y, F67S V9I S12G G138D F86Y, F67S V9I C68R G138D F86Y, F67S V9I G138D F86Y, F67S V9I E157K F86Y, F67S V9I R171K F86Y, F67S S12G F86Y, F67S G19M F86Y, F67S E37Q F86Y, F67S G138D F86Y, F67S E157K F86Y, F67S R171K F86Y, F67S F177L F86Y, F67S A209T, F67S V9I A209T, F67S V9I G19M G138D A209T, F67S V9I S12G G138D A209T, F67S V9I C68R G138D A209T, F67S V9I G138D A209T, F67S V9I E157K A209T, F67S V9I R171K A209T, F67S S12G A209T, F67S G19M A209T, F67S E37Q A209T, F67S G138D A209T, F67S E157K A209T, F67S R171K A209T, F67S F177L A209T, F67S F86Y A209T, F67S V9I F86Y A209T, F67S V9I G19M G138D F86Y A209T, F67S V9I S12G G138D F86Y A209T, F67S V9I C68R G138D F86Y A209T, F67S V9I G138D F86Y A209T, F67S V9I E157K F86Y A209T, F67S V9I R171K F86Y A209T, F67S S12G F86Y A209T, F67S G19M F86Y A209T, F67S E37Q F86Y A209T, F67S G138D F86Y A209T, F67S E157K F86Y A209T, F67S R171K F86Y A209T or F67S F177L F86Y A209T.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además al menos una mutación de codón en comparación con la secuencia de ácido nucleico de la variante de rTA2^S-S2.
- 5 9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde dicho ácido nucleico de interés se expresa en un sistema de expresión eucariota superior.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho ácido nucleico de interés se expresa en una célula de mamífero.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde dicho ácido nucleico de interés comprende una secuencia viral esencial para replicación.
- 10 12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde dicho ácido nucleico de interés comprende al menos parte de un genoma de VIH esencial para replicación.
- 15 13. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual, y la secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o la secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende un codón mutado en posición 67 de amino ácido rTA.
- 20 14. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato y/o un codón en posición 37 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina, y/o un codón de glutamina o de lisina en posición 56 de amino ácido rTA.
- 25 15. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-14, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón de glicina en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato.
- 30 16. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón de alanina, cisteína, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, asparaginas, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina en posición 19 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de glutamato.
- 35 17. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón de histidina, de leucina o de arginina en posición 37 de amino ácido rTA que difiere en al menos dos nucleótidos de un codón de alanina, de lisina o de serina.
- 40 18. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-17, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rTA de cadena individual comprende además un codón en posición 9 de amino ácido rTA que codifica isoleucina, y/o un codón en posición 19 de amino ácido rTA que codifica alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparaginas, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina, y/o un codón en posición 37 de amino ácido rTA que codifica cisteína, metionina, glutamina, treonina, histidina, leucina o arginina, y/o un codón en posición 56 de amino ácido rTA que codifica lisina o glutamina, y/o un codón en posición 67 de amino ácido rTA que codifica serina, y/o un codón en posición 68 de amino ácido rTA que codifica arginina, y/o un codón en posición 86 de amino ácido rTA que codifica tirosina, y/o un codón en posición 138 de amino ácido rTA que codifica aspartato o serina, y/o un codón en posición 157 de amino ácido rTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 171 de amino ácido rTA que codifica lisina, y/o un codón en posición 177 de amino ácido rTA que codifica leucina, y/o un codón en posición 195 de amino ácido rTA que codifica serina, y/o un codón en posición 209 de amino ácido rTA que codifica treonina.
- 45 19. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rTA y/o secuencia de ácido nucleico rTA de cadena individual que codifica comprende F67S F86Y, F67S V9I F86Y, F67S V9I G19M G138D F86Y, F67S V9I S12G G138D F86Y, F67S V9I C68R G138D F86Y, F67S V9I G138D F86Y, F67S V9I E157K F86Y, F67S V9I

- R171K F86Y, F67S S12G F86Y, F67S G19M F86Y, F67S E37Q F86Y, F67S G138D F86Y, F67S E157K F86Y, F67S R171K F86Y, F67S F177L F86Y, F67S A209T, F67S V9I A209T, F67S V9I G19M G138D A209T, F67S V9I S12G G138D A209T, F67S V9I C68R G138D A209T, F67S V9I G138D A209T, F67S V9I E157K A209T, F67S V9I R171K A209T, F67S S12G A209T, F67S G19M A209T, F67S E37Q A209T, F67S G138D A209T, F67S E157K A209T, F67S R171K A209T, F67S F177L A209T, F67S F86Y A209T, F67S V9I F86Y A209T, F67S V9I G19M G138D F86Y A209T, F67S V9I S12G G138D F86Y A209T, F67S V9I C68R G138D F86Y A209T, F67S V9I G138D F86Y A209T, F67S V9I E157K F86Y A209T, F67S V9I R171K F86Y A209T, F67S S12G F86Y A209T, F67S G19M F86Y A209T, F67S E37Q F86Y A209T, F67S G138D F86Y A209T, F67S E157K F86Y A209T, F67S R171K F86Y A209T o F67S F177L F86Y A209T.
- 5
- 10 **20.** Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-19, donde dicha secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende además al menos una mutación en comparación con la secuencia de ácido nucleico de la variante rtTA^{2S}-S2.
- 15 **21.** Una secuencia de amino ácido aislada, sintética o recombinante, codificada por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20.
- 22.** Una secuencia de amino ácido aislada, sintética o recombinante, codificada por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 13 que comprende además una secuencia rtTA y/o una secuencia rtTA de cadena individual, y la secuencia rtTA y/o la secuencia rtTA de cadena individual comprende una isoleucina en posición 9, y/o una alanina, cisteína, aspartato, fenilalanina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparaginas, glutamina, arginina, serina, treonina, valina, triptofano o tirosina en posición 19, y/o una cisteína, metionina, glutamina, treonina, histidina, leucina o arginina en posición 37, y/o una lisina o glutamina en posición 56, y/o una serina en posición 67, y/o una arginina en posición 68, y/o una tirosina en posición 86, y/o un aspartato o serina en posición 138, y/o una lisina en posición 157, y/o una lisina en posición 171, y/o una leucina en posición 177, y/o una serina en posición 195, y/o una treonina en posición 209.
- 20
- 25 **23.** Uso de una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20 para expresión inducible de una secuencia de ácido nucleico de interés.
- 24.** Uso de una secuencia de amino ácido codificada por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20 o una secuencia de amino ácido de acuerdo con la reivindicación 22 para expresión inducible de una secuencia de ácido nucleico de interés.
- 30 **25.** Uso de acuerdo con la reivindicación 23, donde dicha secuencia de ácido nucleico codifica una secuencia de amino ácido que comprende una secuencia de amino ácido de acuerdo con la reivindicación 20.
- 26.** Uso de una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual, y la secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA y/o la secuencia de ácido nucleico que codifica rtTA de cadena individual comprende F67S F86Y A209T, F67S V9I E157K F86Y A209T, F67S V9I R171K F86Y A209T, F67S V9I F86Y A209T, F67S S12G F86Y A209T, F67S G19M F86Y A209T, F67S E37Q F86Y A209T, G12M F67S V9I G138D F86Y A209T, S12G F67S V9I G138D F86Y A209T or C68R F67S V9I G138D F86Y A209T para expresión inducible por tetraciclina y/o inducible por minociclina de un ácido nucleico de interés.
- 35
- 40 **27.** Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20.
- 28.** Un replicón inducible viral que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20, y al menos una secuencia viral que es esencial para replicación bajo control directo o indirecto de dicha secuencia de ácido nucleico.
- 45 **29.** Un replicón inducible viral de acuerdo con la reivindicación 28 que comprende todas las secuencias virales que son esenciales para replicación bajo control directo o indirecto de dicha secuencia de ácido nucleico.
- 30.** Un replicón de acuerdo con la reivindicación 28 o 29, que se deriva de un virus de inmunodeficiencia humana.
- 31.** Un replicón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-30, donde dicha secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20 se inserta al gen nef.
- 50 **32.** Un replicón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-31 que comprende al menos un motivo tetO en al menos un LTR funcional.

- 33.** Un replicón de acuerdo con la reivindicación 32, que comprende al menos 2, 4, 6, u 8 de tales elementos en al menos un LTR funcional.
- 34.** Un replicón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-33, donde al menos un LTR se modifica para evitar reversión al virus de tipo silvestre.
- 5 **35.** Un método para producir un virus dependiente de un agente inductor para replicación, que comprende proveer a una célula permisiva con un replicón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-34, cultivar dicha célula en la presencia de dicho agente de inducción y cosechar dicho virus dependiente a partir de dicho cultivo.
- 36.** Un método de acuerdo con la reivindicación 35 en el que dicho virus dependiente es un virus de inmunodeficiencia humana.
- 10 **37.** Un método de acuerdo con la reivindicación 35 or 36, en el que dicho virus es un virus atenuado.
- 38.** Un virus dependiente de un agente inductor para replicación que puede obtenerse por un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-37.
- 39.** Un virus de acuerdo con la reivindicación 38, que es un virus de inmunodeficiencia humana virus.
- 15 **40.** Una composición inmunogénica que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20, y/o un replicón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-34, y/o un virus de acuerdo con la reivindicación 38 o 39, y un adyuvante y/o soporte adecuados.
- 41.** Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 40, donde dicho replicón y/o dicho virus se derivan de un virus de inmunodeficiencia humana.
- 42.** Un método para la replicación controlada de un virus o de un replicón viral que comprende:
- 20 - proveer a una célula permisiva con un replicón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-34, y/o con un virus según la reivindicación 38 o 39;
- cultivar dicha célula en la presencia de dicho agente inductor; y
- manipular la cantidad de agente inductor presente.
- 25 **43.** Una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20, un replicón según cualquiera de las reivindicaciones 28-34, o un virus según las reivindicaciones 38 o 39, para usar como un medicamento y/o vacuna.
- 44.** Use de una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20, un replicón de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-34, o un virus según cualquiera de las reivindicaciones 38 o 39, para la preparación de un medicamento y/o composición inmunogénica para contrarestar, al menos en parte, y/o tratar SIDA.
- 30 **45.** Una célula aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-20, un replicón según cualquiera de las reivindicaciones 28-34, y/o un virus de acuerdo con la reivindicación 38 o 39.

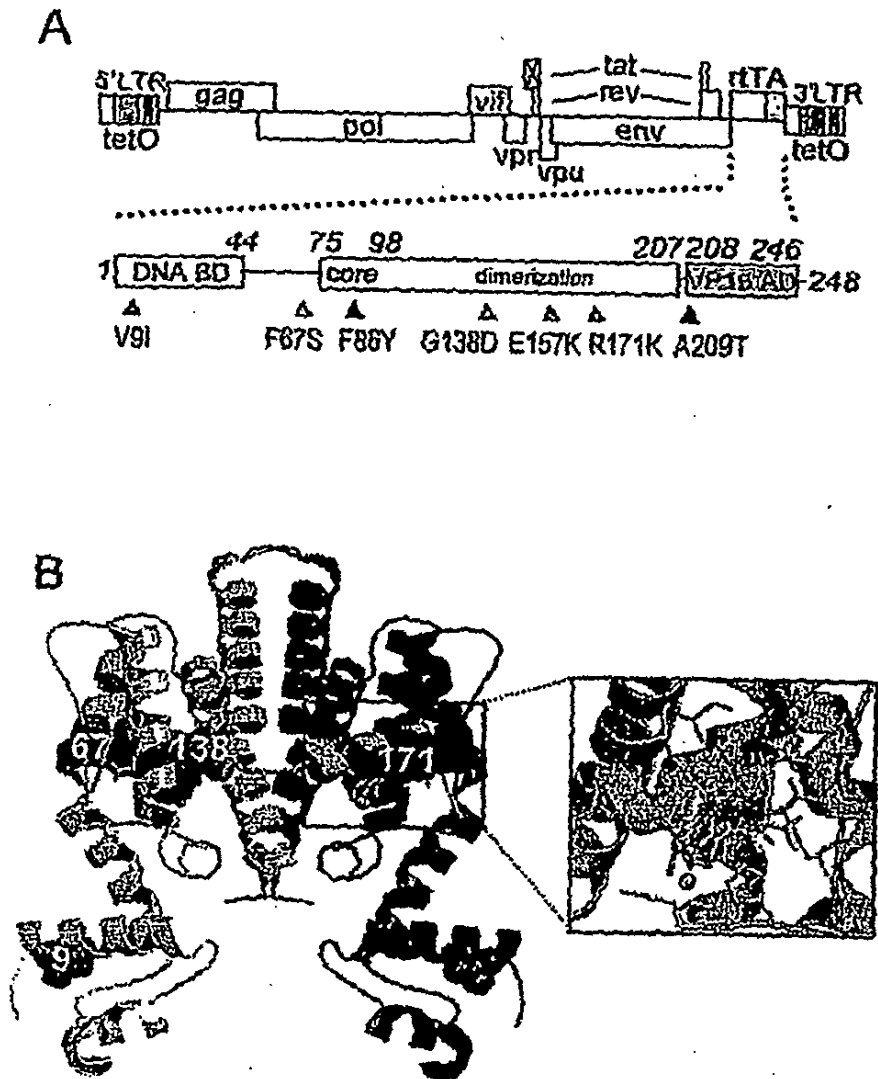


Figura 1

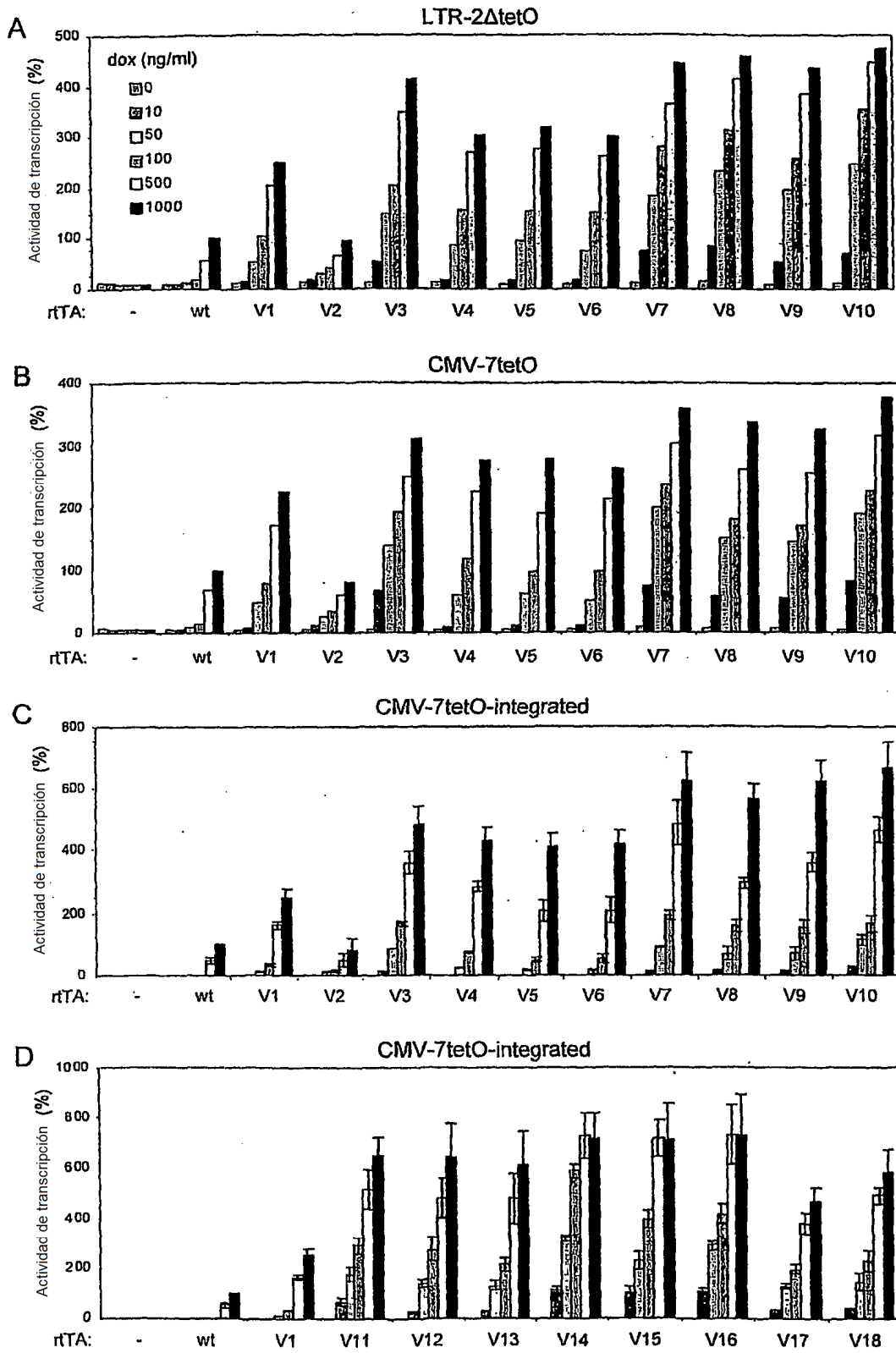


Figura 2

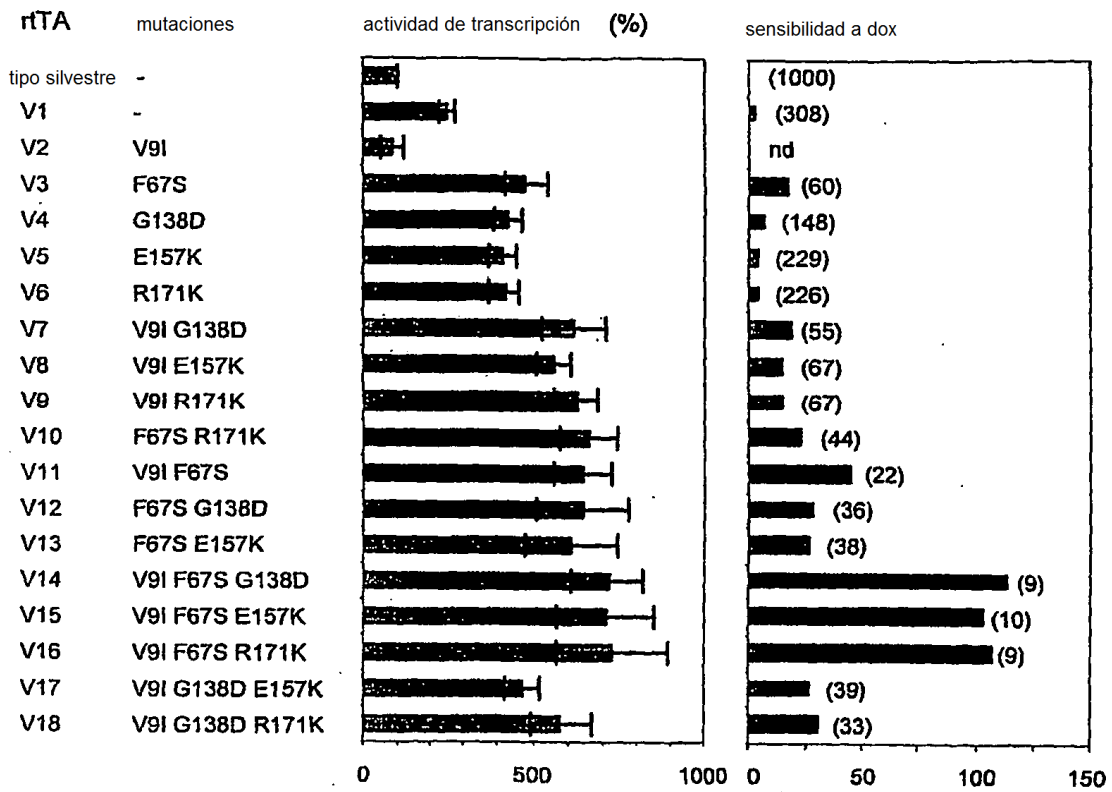


Figura 3

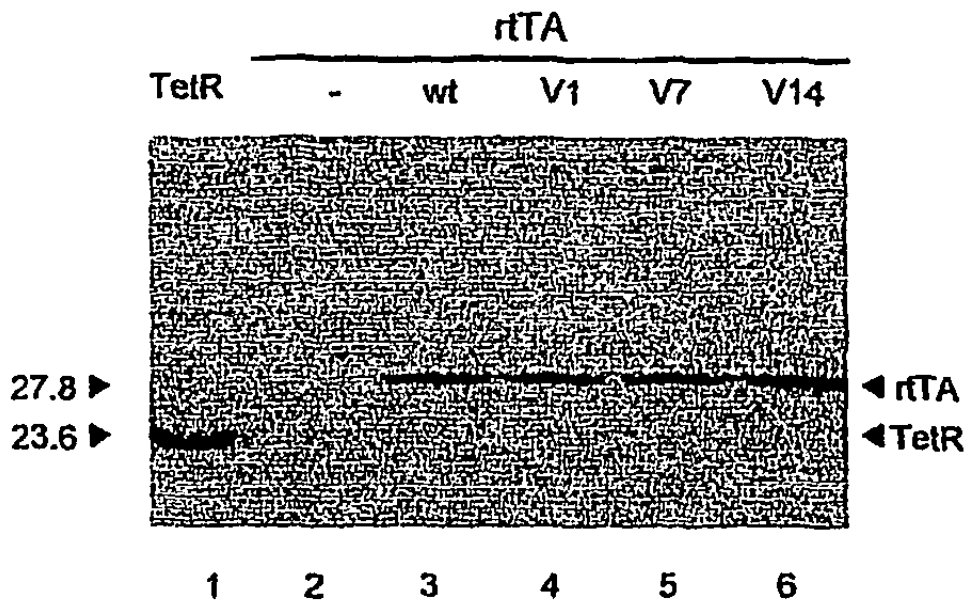


Figura 4

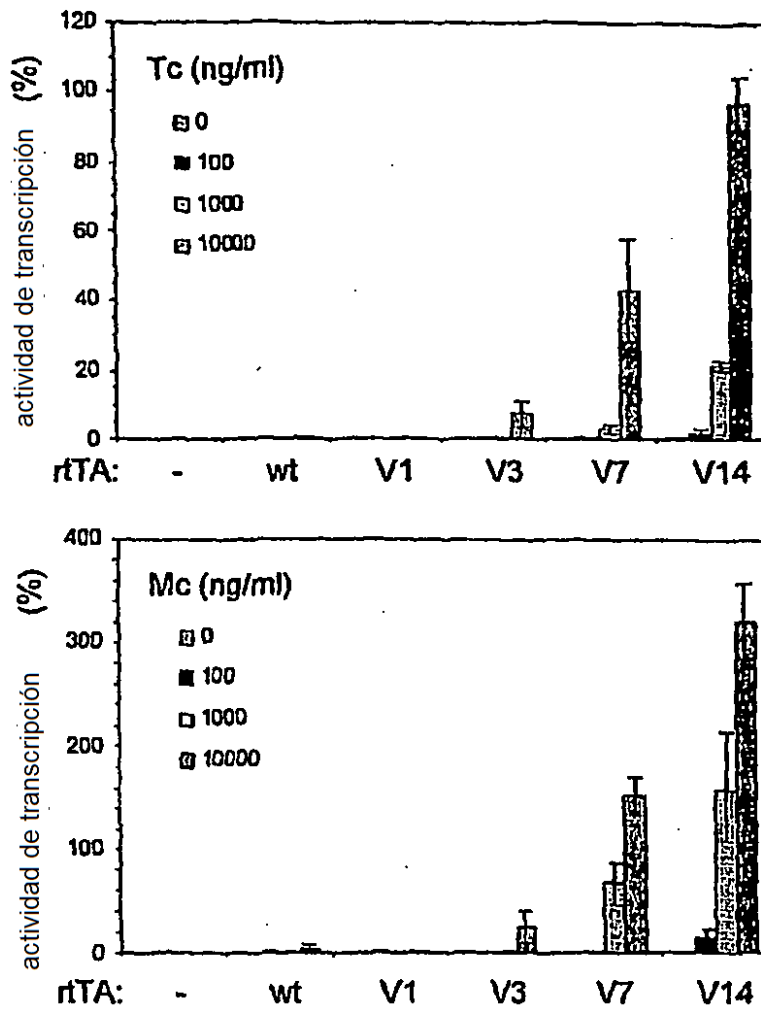


Figura 5

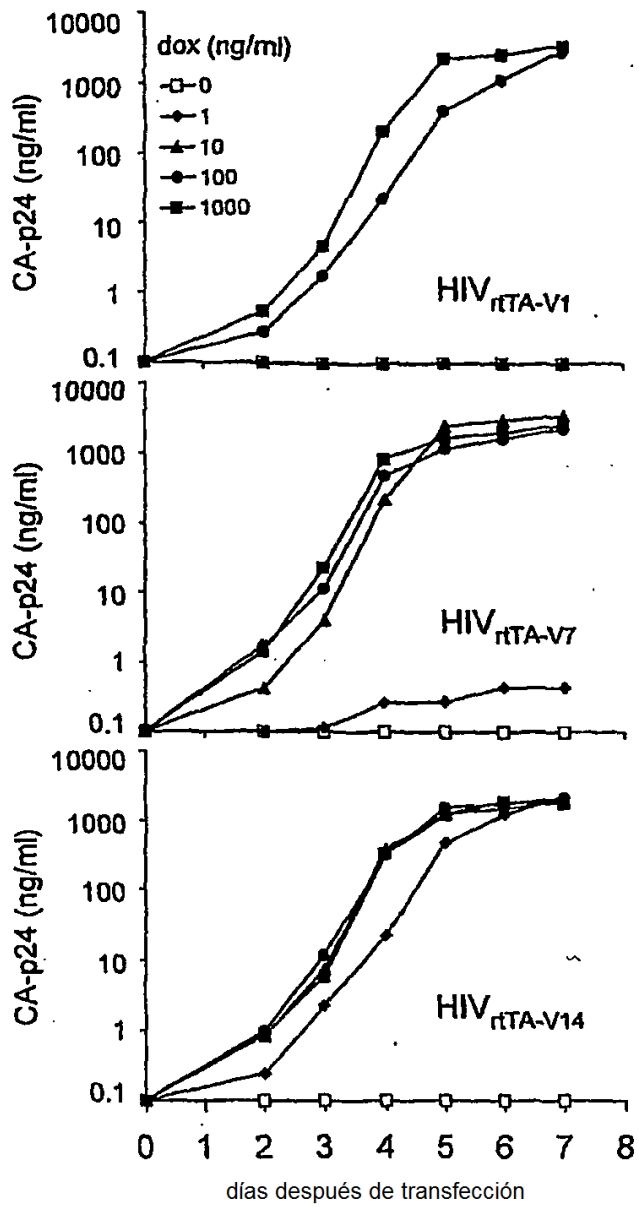


Figura 6

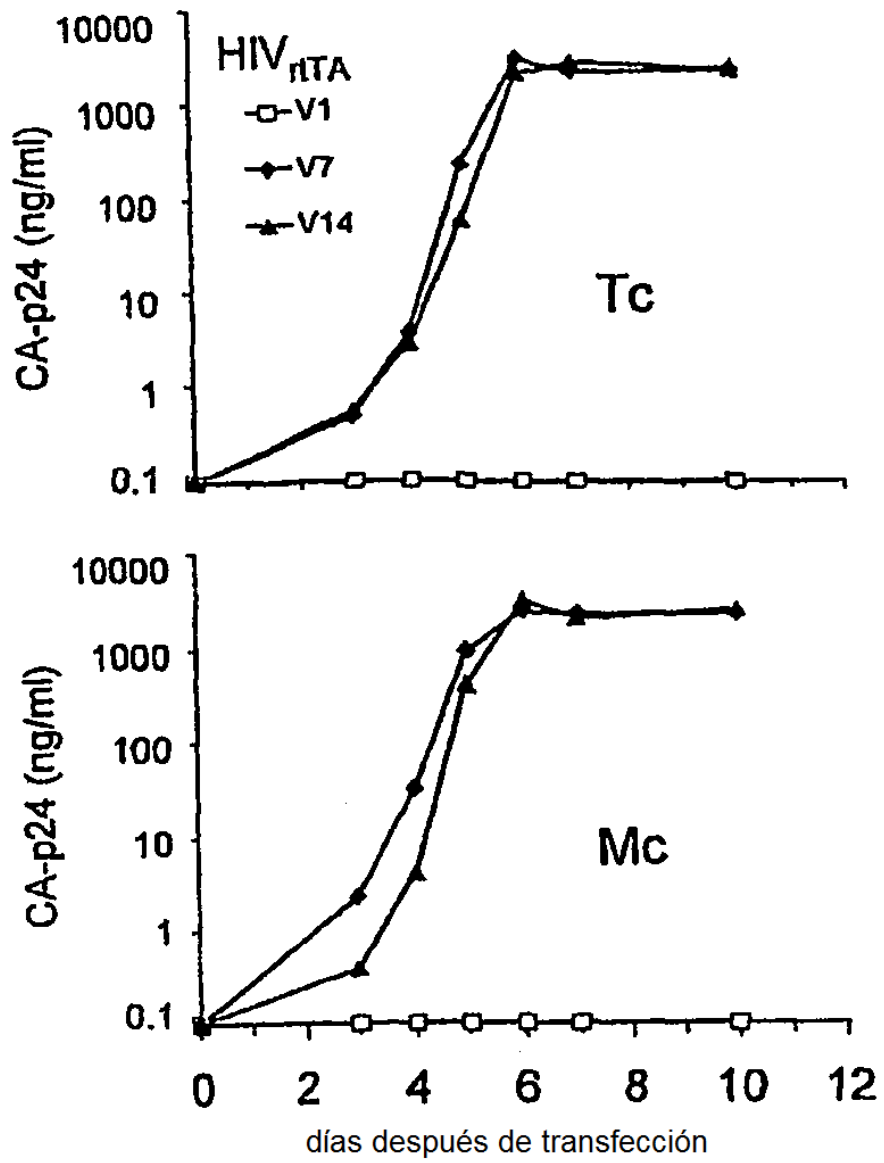
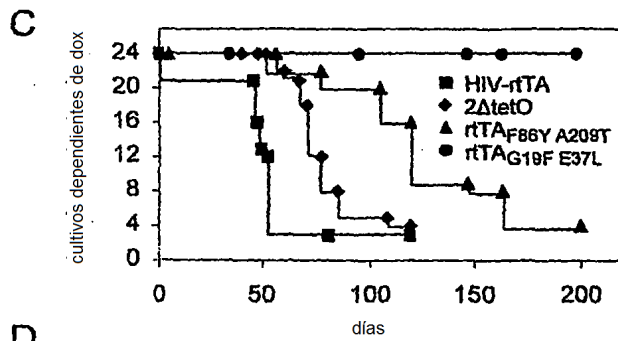
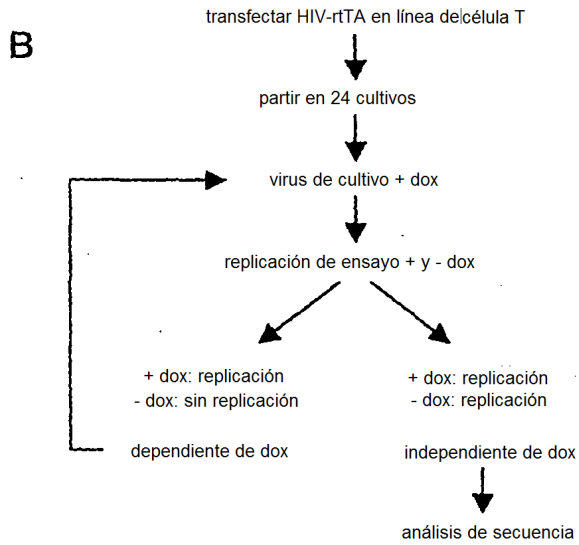
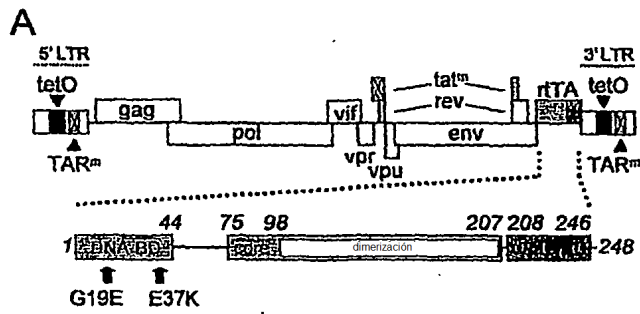


Figura 7



D

Cultivo	Día	Mutación observada en rTA
B3	50	E37K
B4	48	G19E
B5	50	E37K
B6	46	E37K R179Q
C1	48	E37K
C5	50	E37K
C6	50	G19E E156K
D1	48	E37K

Figura 8

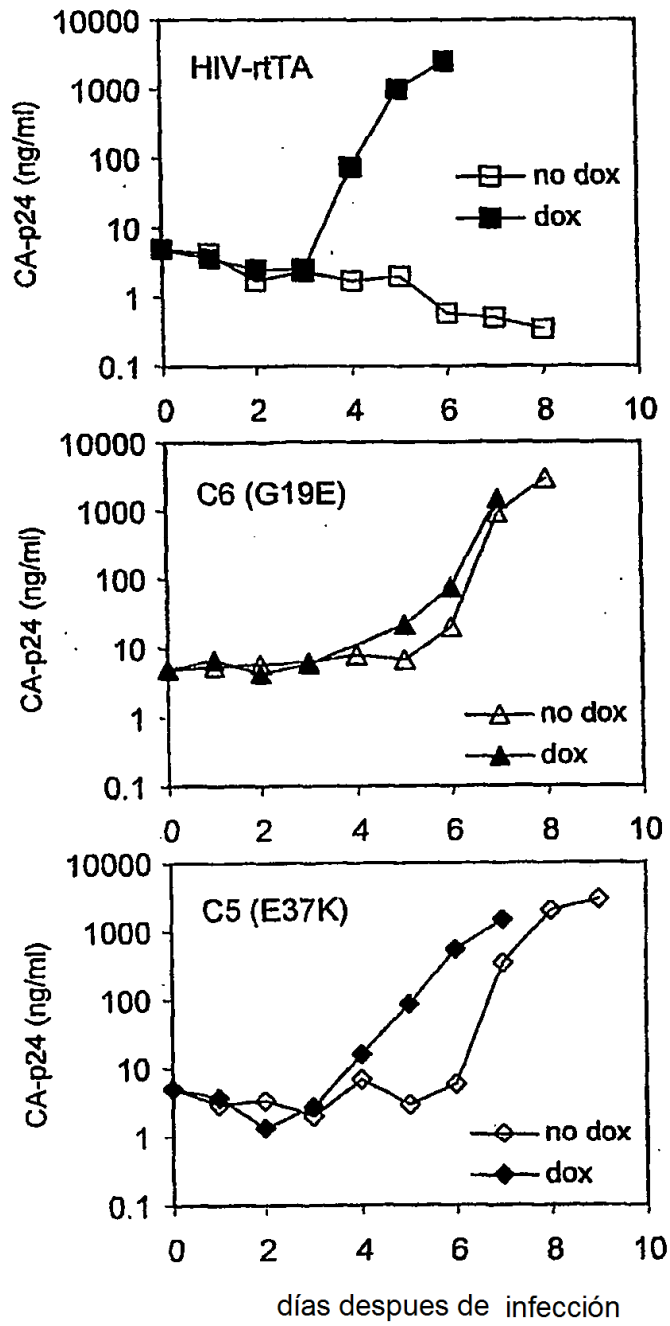


Figura 9

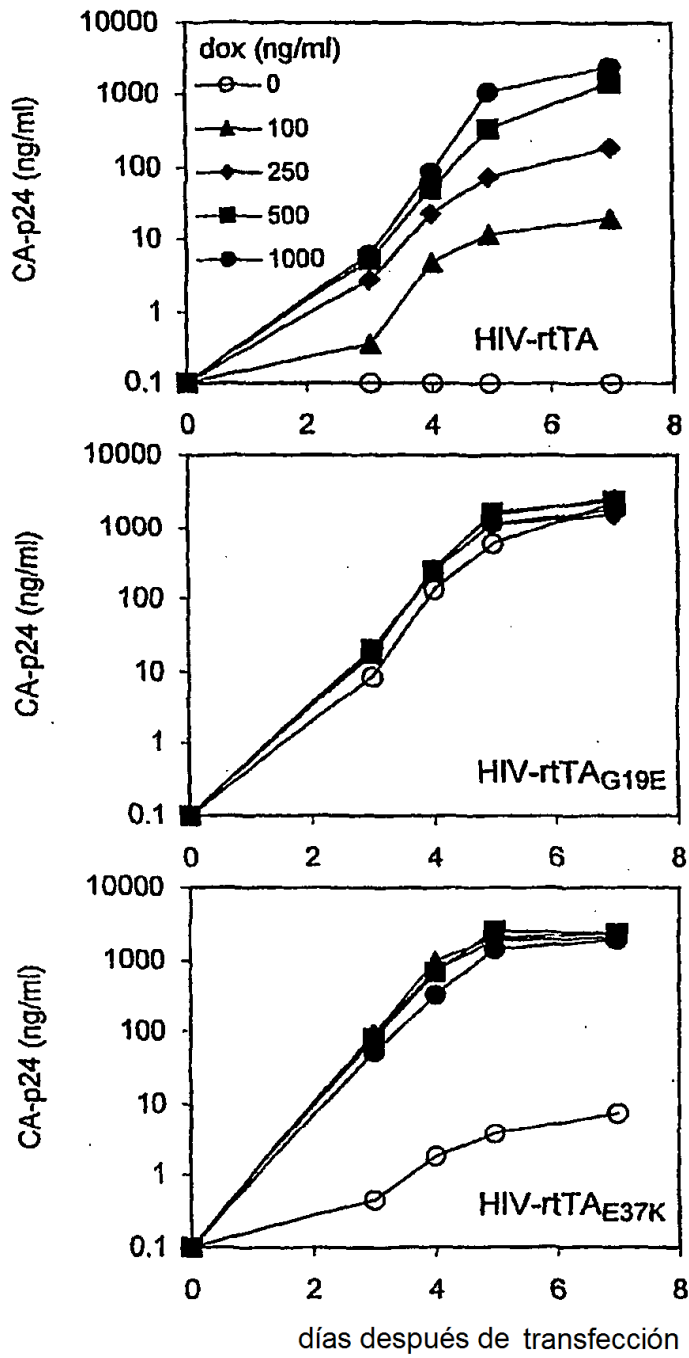


Figura 10

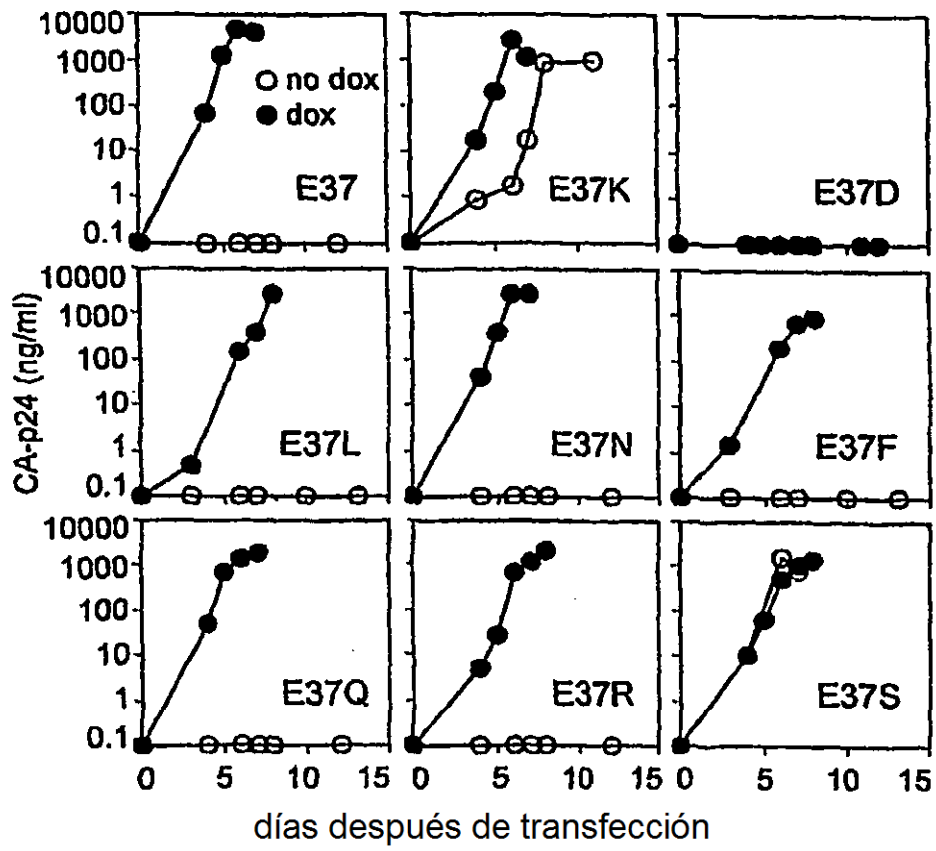


Figura 11

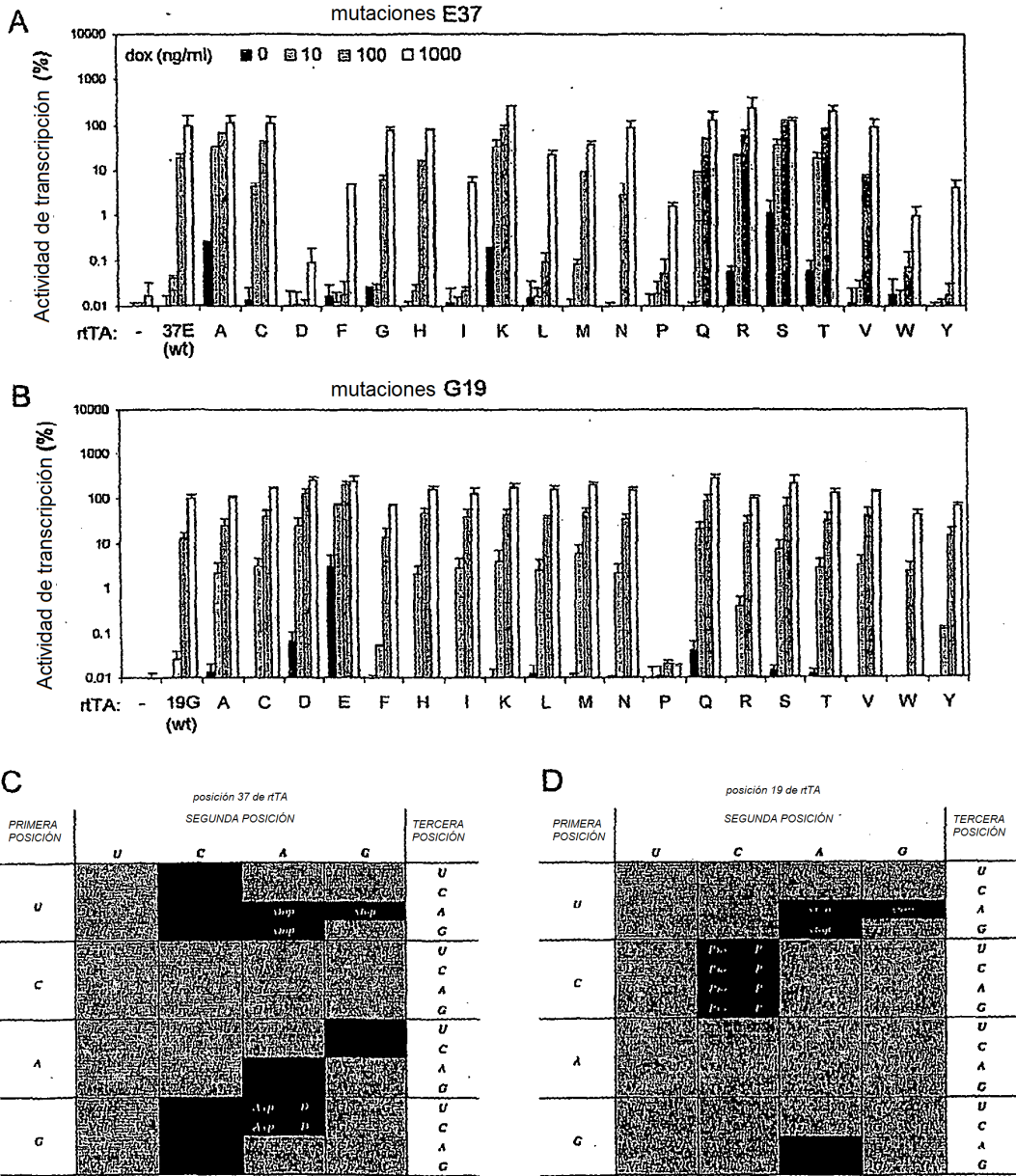


Figura 12

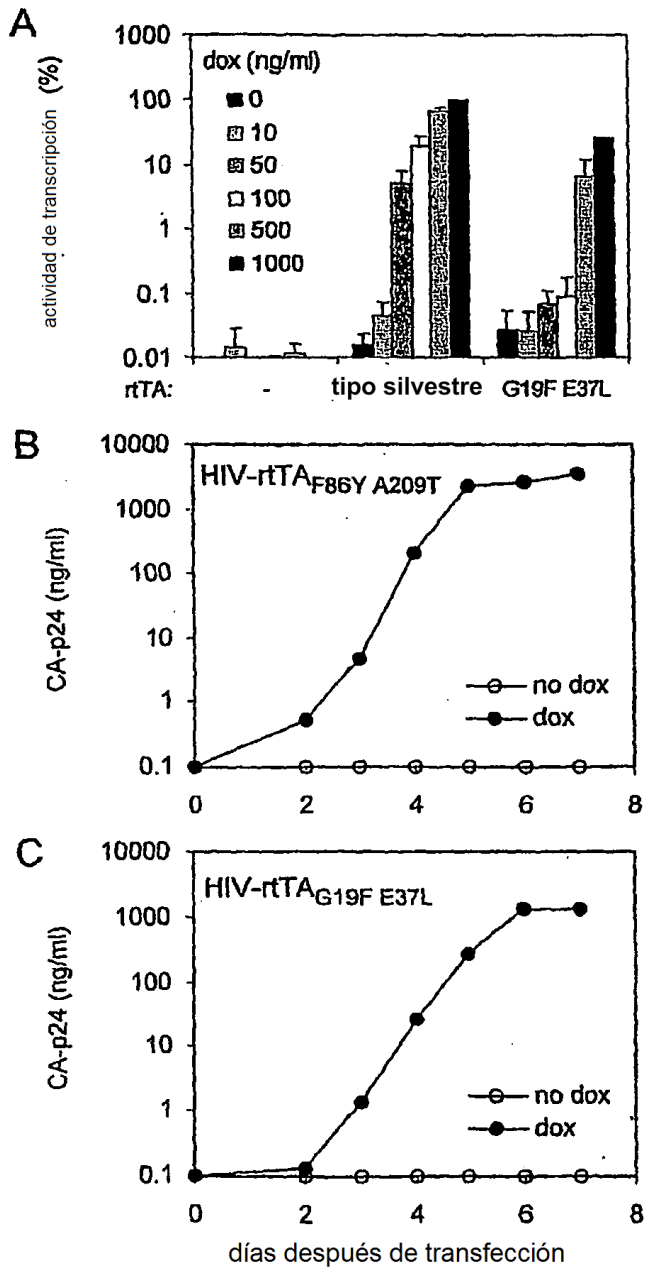


Figura 13

A

rTA	actividad basal	actividad max	sensibilidad x	dox(ng/ml)
wt	0	100	1	1000
F86Y	0.1	253	3.2	314.3
F86Y A209T	0	250	3.2	308.2

B

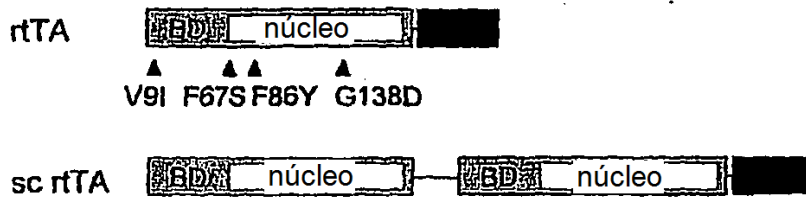
F67S	+ F86Y A209T	0	482	16.7	59.8
G138D	+ F86Y A209T	0	429	6.8	147.5
E157K	+ F86Y A209T	0	414	4.4	228.5
R171K	+ F86Y A209T	0	421	4.4	225.9
V9I G138D	+ F86Y A209T	0	621	18.2	54.9
V9I E157K	+ F86Y A209T	0	560	14.9	67.3
V9I R171K	+ F86Y A209T	0	624	14.9	67.3
F177L	+ F86Y A209T	0	358	4	249
F67S F177L	+ F86Y A209T	0	485	17.5	57.2
C195S	+ F86Y A209T	0	242	3.2	314.6
G138S	+ F86Y A209T	0	39	4.9	206.1
C68R	+ F86Y A209T	0	379	5.2	193
V9I F67S	+ F86Y A209T	0.3	646	44.6	22.4
F67S G138D	+ F86Y A209T	0	644	28	35.7
F67S E157K	+ F86Y A209T	0	615	26.1	38.4
F67S R171K	+ F86Y A209T	0	663	22.7	44
V9I F67S G138D	+ F86Y A209T	0.7	715	113.9	8.8
V9I F67S E157K	+ F86Y A209T	0.3	711	102.8	9.7
V9I F67S R171K	+ F86Y A209T	0.1	730	107	9.3
V9I G138D E157K	+ F86Y A209T	0.5	471	26	38.5
V9I G138D R171K	+ F86Y A209T	0.2	582	30	33.4
S12G F67S	+ F86Y A209T	0	641	45.5	22
G19M F67S	+ F86Y A209T	0	758	56.2	17.8
E37Q F67S	+ F86Y A209T	0.3	647	112.4	8.9
C68R G138D	+ F86Y A209T	0.3	626	23.6	42.3
G19M G138D	+ F86Y A209T	0.4	744	34.2	29.2
E37Q G138D	+ F86Y A209T	0.7	635	34.2	29.2
V9I C68R G138D	+ F86Y A209T	0.5	525	106.4	9.4
V9I G19M G138D	+ F86Y A209T	1.1	751	128.2	7.8
V9I E37Q G138D	+ F86Y A209T	2.7	689	135.1	7.4

Figura 14A y B

F67S	F67S F86Y	F67S A209T
G138D	G138D F86Y	G138D A209T
E157K	E157K F86Y	E157K A209T
R171K	R171K F86Y	R171K A209T
V9I G138D	V9I G138D F86Y	V9I G138D A209T
V9I E157K	V9I E157K F86Y	V9I E157K A209T
V9I R171K	V9I R171K F86Y	V9I R171K A209T
F177L	F177L F86Y	F177L A209T
F67S F177L	F67S F177L F86Y	F67S F177L A209T
C195S	C195S F86Y	C195S A209T
G138S	G138S F86Y	G138S A209T
C68R	C68R F86Y	C68R A209T
V9I F67S	V9I F67S F86Y	V9I F67S A209T
F67S G138D	F67S G138D F86Y	F67S G138D A209T
F67S E157K	F67S E157K F86Y	F67S E157K A209T
F67S R171K	F67S R171K F86Y	F67S R171K A209T
V9I F67S G138D	V9I F67S G138D F86Y	V9I F67S G138D A209T
V9I F67S E157K	V9I F67S E157K F86Y	V9I F67S E157K A209T
V9I F67S R171K	V9I F67S R171K F86Y	V9I F67S R171K A209T
V9I G138D E157K	V9I G138D E157K F86Y	V9I G138D E157K A209T
V9I G138D R171K	V9I G138D R171K F86Y	V9I G138D R171K A209T
S12G F67S	S12G F67S F86Y	S12G F67S A209T
G19M F67S	G19M F67S F86Y	G19M F67S A209T
E37Q F67S	E37Q F67S F86Y	E37Q F67S A209T
C68R G138D	C68R G138D F86Y	C68R G138D A209T
G19M G138D	G19M G138D F86Y	G19M G138D A209T
E37Q G138D	E37Q G138D F86Y	E37Q G138D A209T
V9I C68R G138D	V9I C68R G138D F86Y	V9I C68R G138D A209T
V9I G19M G138D	V9I G19M G138D F86Y	V9I G19M G138D A209T
V9I E37Q G138D	V9I E37Q G138D F86Y	V9I E37Q G138D A209T
V9I G19M F67S G138D	V9I G19M F67S G138D F86Y	V9I G19M F67S G138D A209T
V9I S12G F67S G138D	V9I S12G F67S G138D F86Y	V9I S12G F67S G138D A209T
V9I F67S C68R G138D	V9I F67S C68R G138D F86Y	V9I F67S C68R G138D A209T

Figura 14 C

A



B

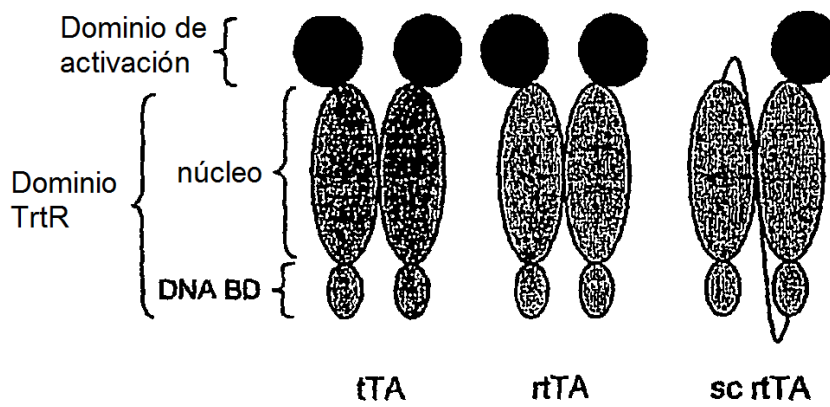


Figura 16

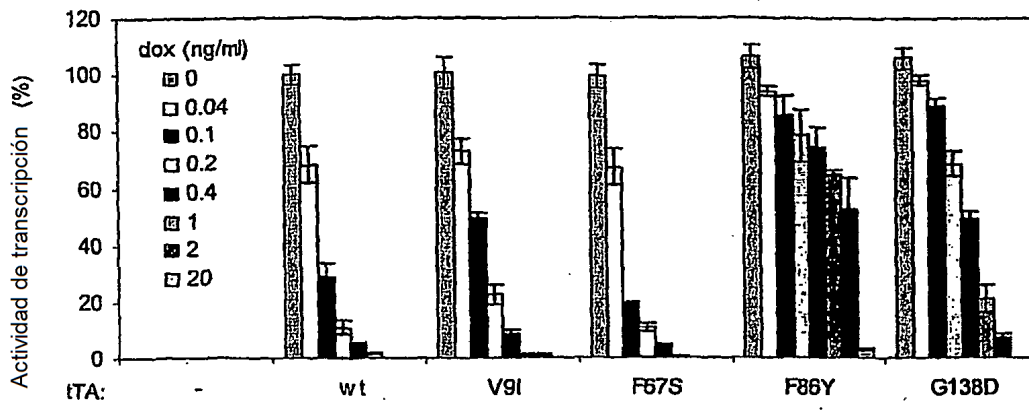


Figura 17

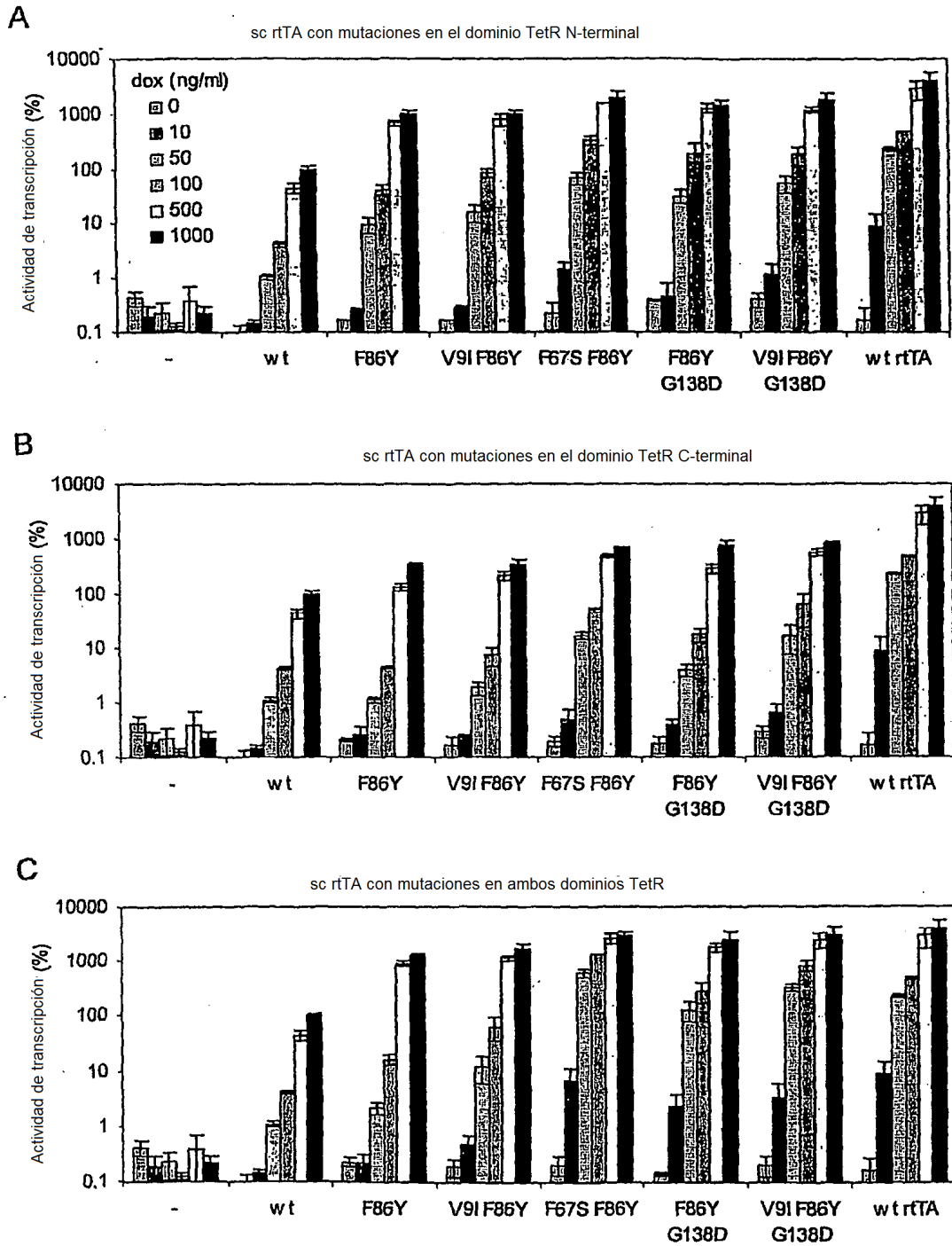


Figura 18

Figura 19: Secuencia de nucleótidos y amino ácidos de rtTA

```

1      ATGTCTAGACTGGACAAGAGCAAAGTCATAAACTCTGCTCTGGAATTACTCAATGGAGTC
1      M S R L D K S K V I N S A L E L L N G V

61     GGTATCGAAGGCCTGACGACAAGGAAACTCGCTCAAAAGCTGGGAGTTGAGCAGCCTACC
21     G I E G L T T R K L A Q K L G V E Q P T

121    CTGTACTGGCACGTGAAGAACAAGCGGGCCCTGCTCGATGCCCTGCCAATCGAGATGCTG
41     L Y W H V K N K R A L L D A L P I E M L

181    GACAGGCATCATACCCACTTCTGCCCCCTGGAAGGCGAGTCATGGCAAGACTTTCTGCGG
61     D R H H T H F C P L E G E S W Q D F L R

241    AACAAACGCCAAGTCATTCGCTGTGCTCTCCTCTCACATCGCGACGGGGCTAAAAGTGCAT
81     N N A K S F R C A L L S H R D G A K V H

301    CTCGGCACCCGCCCAACAGAGAAACAGTACGAAACCCTGGAAAATCAGCTCGCGTTCCTG
101    L G T R P T E K Q Y E T L E N Q L A F L

361    TGTCTAGCAAGGCTTCTCCCTGGAGAACGCACTGTACGCTCTGTCCGCCGTGGGCCACTTT
121    C Q Q G F S L E N A L Y A L S A V G H F

421    ACACTGGGCTGCGTATTGGAGGAACAGGAGCATCAAGTAGCAAAAGAGGAAAGAGAGACA
141    T L G C V L E E Q E H Q V A K E E R E T

481    CCTACCACCGATTCTATGCCCCCACTTCTGAGACAAGCAATFGAGCTGTTGACCGGCAG
161    P T T D S M P P L L R Q A I E L F D R Q

541    GGAGCCGAACCTGCCTTCTTTTCGGCCTGGAACATAATCATATGTGGCCTGGAGAAACAG
181    G A E P A F L F G L E L I I C G L E K Q

601    CTTAAGTGGCAAAGCGGGCGGGCCGGCCGACGCCCTTGACGATTTTGACTTAGACATGCTC
201    L K C E S G G P A D A L D D F D L D M L

661    CCAGCCGATGCCCTTGACGACTTTGACCTTGATATGCTGCCCTGCTGACGCTCTTGACGAT
221    P A D A L D D F D L D M L P A D A L D D

721    TTTGACCTTGACATGCTCCCCGGGTAA
241    F D L D M L P G *
    
```

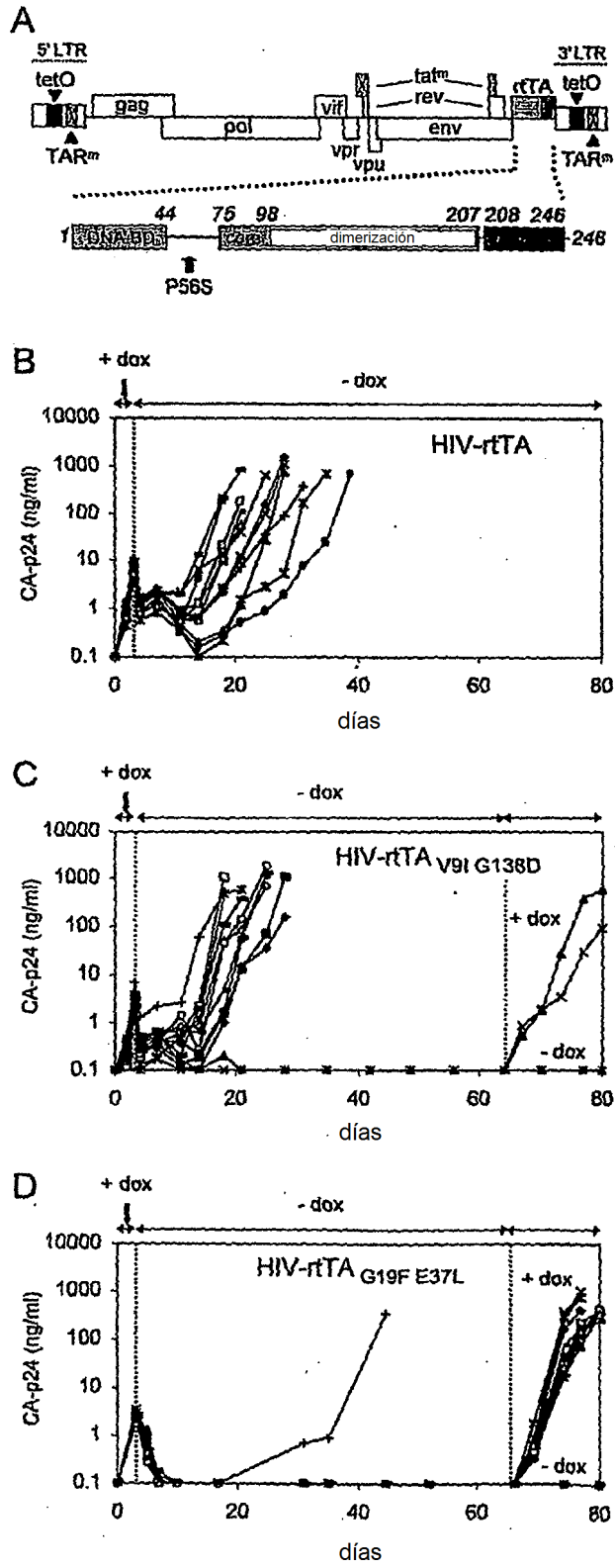


Figura 20

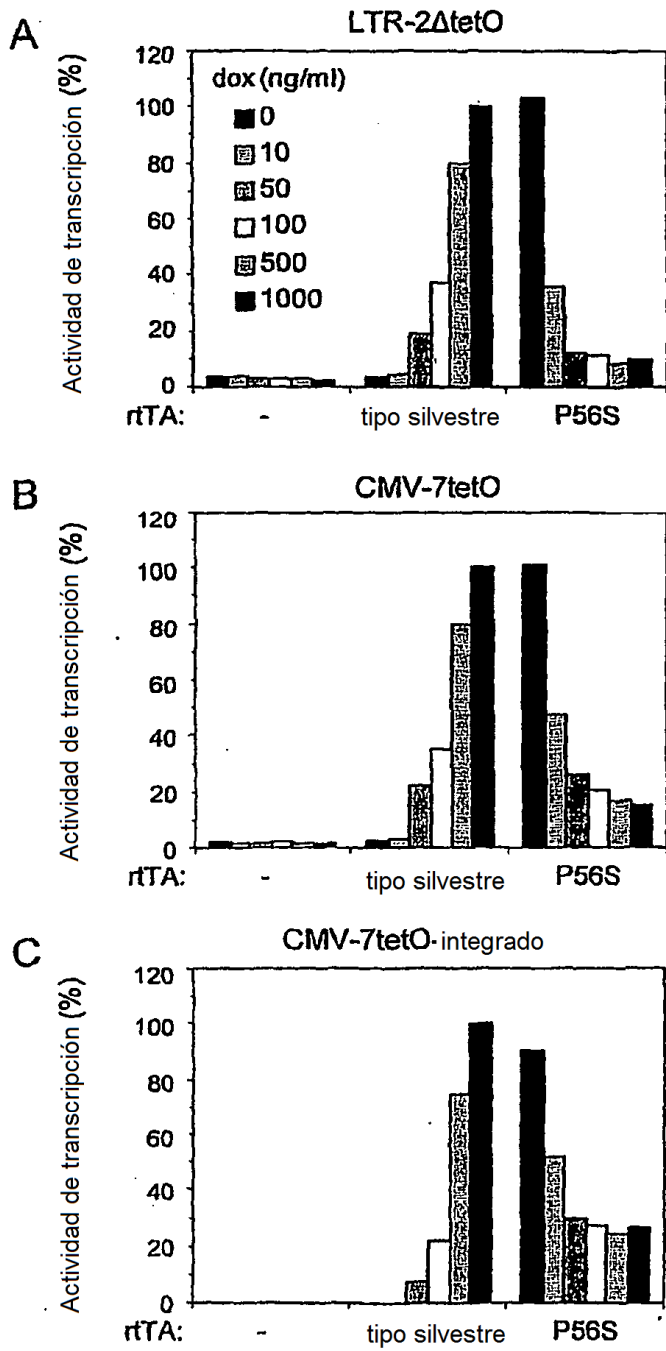


Figura 21

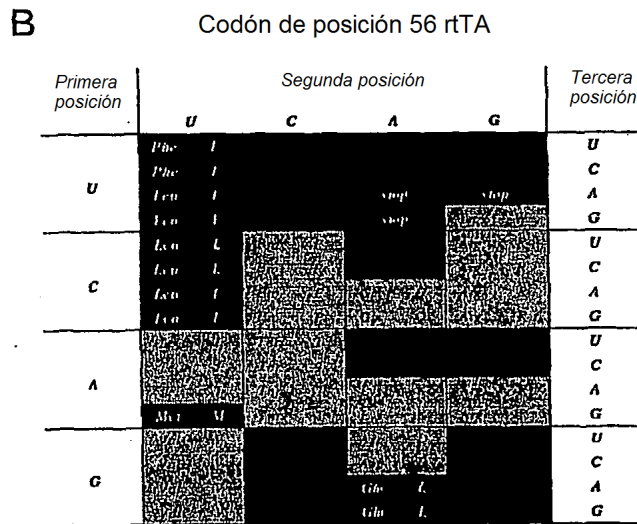
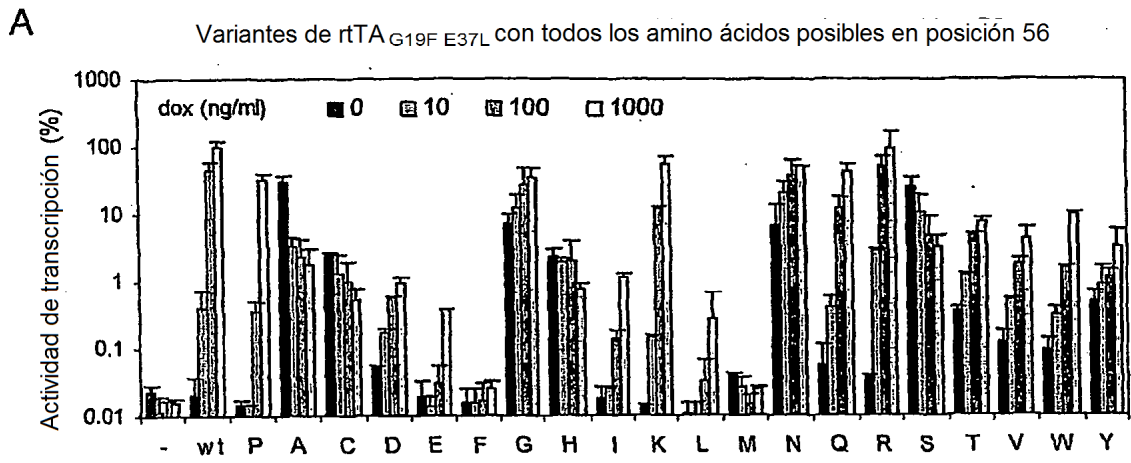


Figura 22

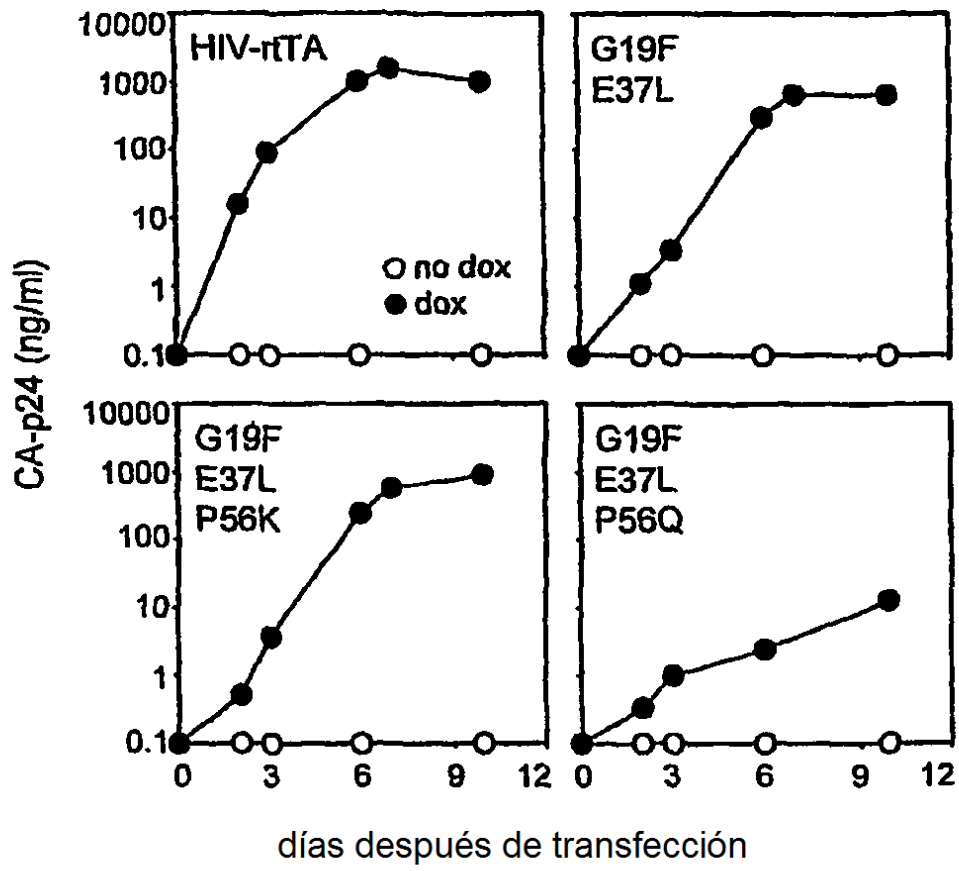


Figura 23

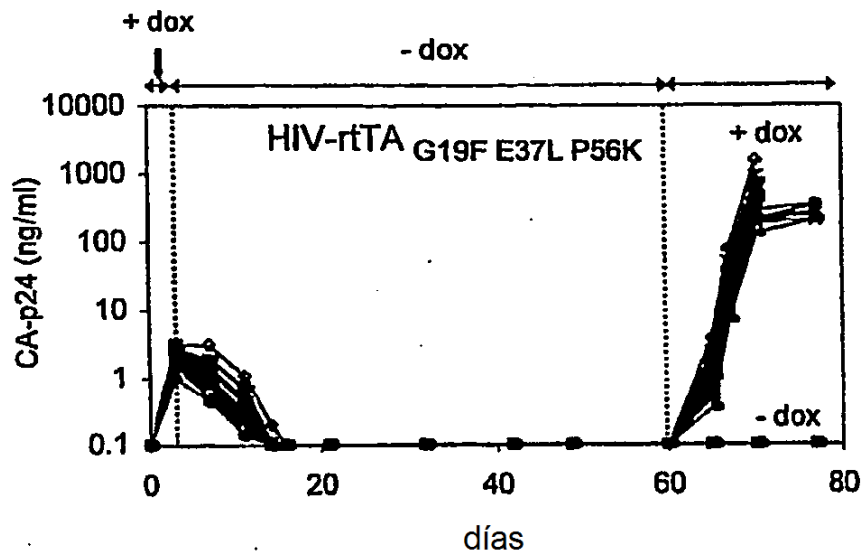


Figura 24