

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 721**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07000486 .6**
96 Fecha de presentación: **10.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1792997**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2007**

54 Título: **ADN de triple hélice lentiviral, y vectores y células recombinantes que contienen ADN de triple hélice lentiviral**

30 Prioridad:
12.10.1999 US 158387 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

73 Titular/es:
**INSTITUT PASTEUR
25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX
75724 PARIS CEDEX 15, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es:
**Charneau, Pierre;
Zennou, Véronique;
Pflumio, Françoise;
Sirven, Aude y
Dubart Kupperschmitt, Anne**

74 Agente/Representante:
Urizar Anasagasti, Jesús María

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).

ES 2 377 721 T3

DESCRIPCIÓN

ADN de triple hélice lentiviral, y vectores y células recombinantes que contienen ADN de triple hélice lentiviral

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, y especialmente a ácidos nucleicos virales y células que contienen ácidos nucleicos virales. Más particularmente, la presente solicitud describe secuencias de ácido nucleico virales que pueden formar parte de estructuras de ADN de triple hélice así como de vectores de ácidos nucleicos, virus, y células que contienen estas secuencias de ácido nucleico virales. La presente invención se refiere, además, a métodos de uso de dichas estructuras de ADN y secuencias de ácido nucleico.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

La transferencia génica en células madre hematopoyéticas (CMH) tiene un gran potencial, tanto para la terapia génica de enfermedades congénitas así como adquiridas, como para el entendimiento de mecanismos que regulan la hematopoyesis normal y patológica. Dado que las CMH tienen grandes capacidades de proliferación, la transferencia génica estable debe incluir la integración genómica del transgén. Los retrovirus basados en virus de la leucemia murina de Moloney (VLMMo) han sido muy populares, dado que se integran en los genomas de las células huésped y pueden permitir la expresión transgénica a largo plazo. Sin embargo, estos oncorretrovirus no se integran en células que no se dividen, y la mayoría de las CMH están inactivas. Se han desarrollado muchos protocolos previos a estimulación usando diferentes asociaciones de citoquinas para desencadenar el ciclo de las CMH con el fin de convertirlas en transducibles mediante vectores de transferencia de genes dependientes de mitosis derivados de oncovirus. Sin embargo, la estimulación de citoquinas induce la diferenciación junto con la proliferación y podrían perderse potencialidades de las CMH durante el proceso de transducción. Este problema puede superarse mediante el uso de vectores derivados de lentivirus, dado que se ha demostrado que los lentivirus infectan tanto a las células que se dividen como a las que no se dividen (Poznansky *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1996). Informes iniciales publicados en los tres últimos años usando dichos vectores derivados de lentivirus para la transducción de las CMH mostraron resultados prometedores pero muy heterogéneos (Case *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 1998; Miyosi *et al.*, 1999).

35 Los lentivirus han desarrollado una estrategia de importación nuclear que permite a su genoma de ADN atravesar la membrana nuclear de una célula huésped. Esta importación nuclear activa de los lentivirus explica su capacidad única, entre los retrovirus, para replicarse eficazmente en células diana que no se dividen, tales como macrófagos tisulares. La restricción de la replicación de oncovirus tales como VLMMo a células que se dividen parece deberse al requisito de la ruptura de la barrera de la membrana nuclear durante la mitosis, permitiendo a los complejos de preintegración (PIC) de VLMMo entrar en el núcleo (Roe *et al.*, 1993). La replicación de lentivirus independiente de mitosis, en el origen de su estrategia de replicación *in vivo* y por tanto de su patogenicidad, ha permitido también la generación de vectores de transferencia génica lentivirales con aplicaciones terapéuticas prometedoras (Poznansky *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1996).

45 La replicación independiente de mitosis de lentivirus fue demostrada por primera vez mediante la infección productiva de células condroides no mitóticas mediante el lentivirus VISNA (Thormar, 1963). Pronto tras su descubrimiento, el VIH demostró replicarse en macrófagos primarios diferenciados (Gartner *et al.*, 1986; Ho *et al.*, 1986). El ADN del VIH se integra en la cromatina de células diana no mitóticas (Weinberg *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1992), lo que implica que los PIC del VIH-1 pueden atravesar la membrana nuclear de las células huésped (Bukrinsky *et al.*, 1992). De este modo, la importación nuclear independiente de mitosis es un suceso fundamental responsable de la capacidad de los lentivirus para replicarse en células que no se dividen.

50 La búsqueda de determinantes virales responsables de la importación nuclear activa del genoma de ADN del VIH-1 ha constituido un campo de investigación activo pero controvertido. La presencia de supuestas señales de localización nucleares (NLS, *nuclear localization signals*) dentro de la matriz (MA) y proteínas virales Vpr ha conducido a la proposición de que éstas podrían actuar de una manera redundante en la importación nuclear de ADN de VIH-1 (Burkinsky *et al.*, 1993b; Emerman *et al.*, 1994; Popov *et al.*, 1998; von Schwedler *et al.*, 1994). Se ha propuesto que la fosforilación de un pequeño subconjunto (1%) de moléculas de la MA en un resto de tirosina C-terminal activa su liberación de la membrana plasmática y su asociación con la proteína integrasa del VIH-1 (Gallay *et al.*, 1995a; 1995b). La aportación de estas proteínas a las propiedades cariofílicas de los PIC del VIH es actualmente un asunto de un controvertido debate (Freed y Martin, 1994; Freed *et al.*, 1995; Fouchier *et al.*, 1997; Freed *et al.*, 1997; Koosra y Schuitemaker, 1999). Más recientemente, se han identificado motivos de NLS en la proteína integrasa (IN) y se ha descrito que mutaciones de estos motivos suprimen la interacción de IN con carioferina α , un receptor de NLS celular (Gallay *et al.*, 1997).

65

Resumen de la invención

5 Sea cual sea el papel de estas proteínas virales candidatas en la importación nuclear del VIH, la presente invención muestra que el propio genoma de VIH-1 retrotranscrito lleva un determinante que actúa en posición cis para su importación nuclear.

10 La invención proporciona un ácido nucleico que comprende una estructura (triple hélice) de triple cadena, tal como una de un lentivirus. La triple hélice estimula la entrada de ácidos nucleicos en el núcleo de las células. El ácido nucleico puede contener las secuencias que actúan en posición cis cPPT y CTS de un lentivirus. El lentivirus puede ser cualquier lentivirus, incluyendo, aunque sin limitarse a, VIH-1, VIH-2, VISNA, VAIE, VIF, y AEC. En realizaciones, el ácido nucleico está en el contexto de un vector, tal como un vector de expresión.

15 Por lo tanto, la solicitud también describe un vector, por ejemplo, un vector de ácido nucleico. El vector de ácido nucleico puede incluir secuencias de cualquier vector conocido por el especialista en la técnica como útiles para la transferencia de ácidos nucleicos al interior de células o para la expresión de ácidos nucleicos *in vivo* o *in vitro*.

La solicitud describe además virus y células (eucariotas y procariotas) que contienen el ácido nucleico descrito en este documento. Las células pueden ser células recombinantes.

20 La solicitud describe adicionalmente un método de transferencia de ácidos nucleicos a un núcleo de célula huésped, por ejemplo, exponiendo la célula huésped al ácido nucleico, vector, virus o célula de la invención, para proporcionar una célula recombinante. Este método permite la transferencia de alta eficacia de ácidos nucleicos al núcleo de la célula huésped, tal como el núcleo de una célula madre hematopoyética. La transferencia de alta eficacia permite al especialista en la técnica poner en práctica diversos métodos de tratamiento, incluyendo, aunque sin limitarse a, métodos de tratamiento profiláctico, métodos de tratamiento de mejora y métodos de tratamiento curativo. Por ejemplo esta invención permite métodos de terapia génica. En general, la terapia génica puede usarse para tratar enfermedades sanguíneas, enfermedades del cerebro, enfermedades víricas así como muchas otras enfermedades congénitas y adquiridas.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 muestra que la iniciación central de la transcripción inversa es una etapa importante en el ciclo de replicación del VIH-1.

35 (A) Mutaciones introducidas en la secuencia cPPT del VIH-1. Se construyeron virus mutantes cPPT conservativos y semiconservativos. El mutante semiconservativo cPPT-D contiene 10 mutaciones en el cPPT 19-mero. El mutante cPPT-AG es su virus control en el que una única mutación purina a purina introduce el mismo cambio de aminoácidos en la región codificante para la integrasa de solapamiento. Las mutaciones se muestran en escritura inversa.

40 (B) Impacto de las mutaciones en cPPT sobre la infectividad del VIH-1. La cinética de replicación de virus en PBL estimulados con PHA (panel izquierdo) y células MT4 (panel derecho). Las células se infectaron con cantidades equivalentes de partículas virales según los contenidos de antígeno (p24) de la cápsida de sobrenadantes virales. Se realizó un seguimiento en el tiempo de la producción de virus mediante actividad de la RT.

45 (C) Valoraciones de virus de ciclo único en células P4 tratadas con afidicolina que se dividen o que no se dividen (HeLa CD4-LTR LacZ). Se midió la actividad de la β-galactosidasa usando un ensayo quimioluminiscente. Los resultados se expresan como unidades de luz relativas (ULR)/s/ng de p24 del inóculo, media ± DE de cuatro experimentos independientes.

50 La figura 2 representa mutaciones en la cPPT que no afectan a la producción de virus, a la síntesis de ADN viral ni a la capacidad del ADN viral de integrarse *in vitro*.

55 (A) Efecto de mutaciones en la cPPT sobre la producción de virus. Se transfectaron células HeLa transitoriamente con plásmidos pLAI, pcPPT-AG, o pcPPT-D. La producción de virus se midió mediante la cuantificación del antígeno viral p24 en sobrenadantes celulares, 48 horas después de la transfección.

60 (B) Efecto de mutaciones en la cPPT sobre la eficacia de la transcripción inversa. Se infectaron células P4 con las mismas cantidades de partículas virales (300 ng de antígeno p24 por 10⁶ células) y se extrajo ADN 12 horas más tarde. Las cantidades totales de ADN viral transcrito de forma inversa, representado mediante un fragmento de VIH-1 MscI interno, se detectaron mediante transferencia de Southern usando el mismo fragmento de ADN como sonda y se cuantificaron usando un aparato phosphorimager.

65 (C) Efecto de mutaciones en la cPPT sobre la integración *in vitro*. Se co-cultivaron células MT4 con células H9-LAI o H9-cPPT-225 infectadas de forma crónica. La integración *in vitro* de complejos de preintegración virales, aislados del citoplasma de células infectadas, se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Farnet y Haseltine, 1990).

Cada pista se carga cada con ADN citoplasmático de 2×10^8 células infectadas.

La figura 3 muestra que los virus mutantes de ADN de triple hélice central son defectuosos en la importación nuclear de ADN viral.

5 (A) Estrategia para el seguimiento cuantitativo de las síntesis, circularización e integración de ADN del VIH-1. Se extrajo el ADN de células infectadas en varios momentos después de la infección, se digirió con *MscI* y *XhoI* y se analizó mediante transferencia de Southern usando una sonda que se solapa con el sitio de *MscI* en 5'. El fragmento de ADN de 1,9 kb interno, común a todas las especies de ADN viral independientemente de su estado integrado o no integrado, indica la cantidad total de ADN viral en células infectadas. Las señales de 2,6 kb, 2,8 kb y 3,4 kb corresponden, respectivamente, a ADN lineal no integrado, se revelaron ADN circulares de una y dos LTR. Dado que la sonda generada por PCR se solapa exactamente con el sitio de *MscI*, la intensidad de cada banda es directamente proporcional a la cantidad de las especies de ADN virales correspondientes. Por lo tanto, puede calcularse la cantidad de ADN proviral integrado sustrayendo de la cantidad total de ADN viral, las señales de ADN viral lineal y circular no integrado.

20 (B) Análisis de transferencia de Southern del procesamiento de ADN viral en células infectadas. Se infectaron células P4 con cantidades equivalentes de cada virus, normalizado en los contenidos de p24 de los sobrenadantes. Se lisaron las células infectadas en diferentes momentos después de la infección, se extrajo ADN y se usó para el análisis cuantitativo descrito anteriormente.

25 (C) Perfiles de ADN viral intracelular, una vez completado un ciclo de infección (48 horas después de la infección). Los resultados se expresan como porcentajes del ADN viral total. Se obtuvieron perfiles de ADN intracelular similares usando células MT4 (no se muestran los datos).

La figura 4 muestra que el ADN lineal de los virus mutantes de triple hélice de ADN central se acumula en las proximidades de la membrana nuclear.

30 (A) Fraccionamiento de núcleo/citoplasma de células P4 infectadas. Análisis por transferencia de Southern de ADN viral de fracciones nucleares (N) y citoplasmáticas (C), 24 horas después de la infección. Se llevó a cabo el fraccionamiento basado en lisis con triton tal como se ha descrito anteriormente (Belgrader *et al.*, 1991). Se restringió el ADN con *MscI* y se hibridó usando la sonda que se solapa en el sitio de *MscI*.

35 (B) Detección de genomas de VIH-1 individuales mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Se infectaron células P4 a alta multiplicidad ($2 \mu\text{g}$ de antígeno p24 por 10^6 células), y se hibridaron usando una sonda de genoma de VIH-1 de longitud completa. Se amplificaron las señales fluorescentes mediante precipitación de tiramida. Se analizaron secciones ópticas a través de células mediante microscopía de deconvolución.

40 La figura 5 muestra que la inserción de la triple hélice de ADN central en un vector basado en VIH-1 potencia la transducción de GFP y la importación nuclear del genoma de ADN del vector.

45 (A) Diagrama esquemático de los genomas del vector. Se insertaron secuencias activas cis centrales cPPT y CTS del genoma de VIH-1, responsables de la formación de la triple hélice de ADN durante la transcripción inversa, en una posición central en el vector GFP de HR descrito anteriormente (Naldini *et al.*, 1996). TRIPinv-GFP incluye la secuencia de triple hélice de ADN central en la orientación inversa, no funcional.

50 (B) Eficacia comparativa de la transducción de GFP usando vectores de VIH con o sin una triple hélice de ADN central. Se usaron células HeLa que se dividen o que no se dividen (tratadas con afidicolina) como dianas. Se cuantificó la fluorescencia de GFP 48 horas después de la transducción usando un fluorómetro de microplacas (Wallac). Los resultados se expresan como la media \pm DE de un experimento representativo llevado a cabo por triplicado. Se sustrajo la actividad de pseudotransducción de GFP de la señal.

55 (C) Análisis por transferencia de Southern del procesamiento del ADN vectorial en células transducidas. Se lisaron células HeLa transducidas en momentos diferentes después de la infección, se extrajo el ADN, se restringió y se realizó transferencia de Southern usando una estrategia similar que para los virus. La digestión de *MscI* se sustituye por *EcoNI* y *Avall*, y la sonda es un fragmento de ADN de PCR que se solapa exactamente con el sitio de *EcoNI*.

60 (D) Análisis cuantitativo del estatus intracelular del ADN vectorial, 48 horas después de la infección. Los resultados se presentan como porcentajes del ADN vectorial total.

La figura 6 representa un modelo para la importación nuclear del genoma de VIH-1 dependiente de la triple hélice de ADN.

65 (A) Visión general del fenotipo de virus mutantes de la triple hélice de ADN central observado. Las etapas de iniciación y terminación centrales de la transcripción inversa del VIH-1 generan una estructura ADN flap (solapado) de cadena positiva larga: la triple hélice de ADN central. La cadena positiva de VIH-1 se sintetiza como dos

segmentos semi-genómicos discretos. Se inicia un segmento cadena abajo en una copia central de la secuencia de tracto de polipurina (cPPT). El segmento cadena arriba termina cadena abajo de la cPPT, tras un suceso de desplazamiento de una cadena de 99 nucleótidos de longitud, bloqueado por la secuencia de terminación central (CTS). Una vez finalizado un ciclo único de infección, el ADN viral de un virus de tipo silvestre se procesa casi completamente a provirus integrado ($\approx 55\%$); ADN circular de 1 LTR ($\approx 35\%$) y 2 LTR ($< 5\%$); mientras que una pequeña fracción permanece como ADN lineal ($< 10\%$). Las mutaciones en la cPPT afectan a la formación de la triple hélice de ADN central. El producto de transcripción inversa final de un virus mutante de iniciación central es un ADN lineal de doble cadena continuo, que carece de la triple hélice de ADN central (Charneau *et al.*, 1992). El ADN viral de virus mutantes cPPT-D se acumula en células infectadas como moléculas de ADN lineal, y se localiza en las proximidades de la membrana nuclear.

(B) Dos mecanismos especulativos para la importación nuclear del genoma de VIH-1 dependiente de la triple hélice por medio de la maduración del complejo de transcripción inversa (RTC) a un complejo de preintegración (PIC) y translocación de ADN lineal a través del poro nuclear. La transcripción inversa de VIH-1 se produce probablemente dentro de un complejo estructurado (ordenado) rodeado por un conjunto de proteínas de la cápsida. El tamaño de RTC supera el diámetro de exclusión del poro nuclear. Antes de la translocación, el RTC experimenta una maduración a un PIC más pequeño con pérdida de las proteínas de la cápsida (Karageorgos *et al.*, 1993). La formación de la triple hélice de ADN señala el final de la síntesis de ADN viral y podría señalar la salida del ADN de VIH del conjunto de la cápsida. En el PIC, se unen entre sí los extremos del ADN lineal probablemente después de la dimerización de las proteínas integrasas unidas a las puntas de las LTR (Miller *et al.*, 1997). Estando el ADN de triple hélice en una posición central, una estructura lógica para el PIC de VIH-1 sería un filamento doble, plegado simétricamente en cada lado de la triple hélice central por la dimerización de integrasa. La triple hélice de ADN constituiría entonces un ápice que podría interactuar con proteínas lanzadera cariofílicas, permitiendo el paso del filamento de ADN de VIH-1 a través del poro nuclear. En virus mutantes de cPPT, una falta de maduración de RTC a PIC induciría una acumulación de cápsidas virales integrales en el poro nuclear. Como alternativa, la ausencia de la triple hélice de ADN en el ADN lineal mutante de cPPT impide la interacción con proteínas lanzadera impidiendo la translocación del genoma de VIH-1 a través del poro nuclear. En ambos casos, el ADN de virus mutantes de cPPT se acumula como ADN lineal en las proximidades de la membrana nuclear.

La figura 7 muestra los resultados de los experimentos de transducción utilizando células CD34+ sanguíneas del cordón umbilical humano.

(A) Análisis FACS (citometría de flujo) de células CD34+ sanguíneas de cordón umbilical humano transducidas durante 24 horas en presencia de 100 ng/ml de P24 viral en las condiciones descritas en este documento. El análisis se llevó a cabo 48 horas después del lavado de las células al final del periodo de transducción de 24 horas. Los porcentajes se expresan como proporciones de células hematopoyéticas separadas morfológicamente. La media X indica el valor medio de la intensidad de fluorescencia verde.

(B) Se analizó la expresión de la GFP en el día 5 después de la transducción.

La figura 8 representa esquemáticamente el efecto de la dosificación viral sobre la eficacia de la transfección.

(A) El porcentaje de células CD34+ que expresan eGFP.

(B) El valor medio de la intensidad de fluorescencia de GFP de células CD34+eGFP+.

(C) El valor medio de la intensidad de fluorescencia de GFP de células CD34+eGFP+ multiplicado por el porcentaje de células CD34+eGFP+. Se transdujeron células CD34+ durante 24 horas en las condiciones especificadas en este documento con el vector lentiviral que incluye la secuencia codificante de eGFP bajo el control del promotor CMV, y que incluye (línea continua) o sin (línea discontinua) la estructura de triple hélice. El análisis se llevó a cabo 48 horas después del lavado de las células al final del periodo de transducción de 24 horas.

La figura 9 representa el análisis FACS de células CD34+ sanguíneas de cordón umbilical humano transducidas durante 24 horas en las condiciones descritas en el texto con un vector lentiviral que tiene una LTR de VIH-1 intacto (paneles izquierdos) o una LTR de VIH-1 con U3 delecionada (paneles derechos) y un promotor CMV interno (paneles superiores) o el promotor alfa EF-1 (paneles inferiores).

(A) Se llevó a cabo el análisis 48 horas después del lavado de las células al final del periodo de transducción de 24 horas.

(B) Se llevó a cabo el análisis 120 horas después del lavado de las células al final del periodo de transducción de 24 horas. El análisis distingue entre células CD34 brillantes (inmaduras) y sin brillo.

Los porcentajes se expresan como proporciones de células hematopoyéticas separadas morfológicamente. El segundo número, cuando se indica, representa la media de la fluorescencia verde.

Descripción detallada de la invención

Se ha demostrado previamente que el VIH-1 ha desarrollado una estrategia de transcripción inversa compleja, que difiere de la de los oncovirus en dos etapas que se producen en el centro del genoma: una iniciación adicional de síntesis de cadena positiva acoplada a una etapa de terminación. Se sintetiza el ADN de cadena positiva de VIH-1 como dos segmentos semi-genómicos diferenciados. Una copia adicional de la secuencia activa en cis del tracto de polipurina, presente en el centro de todos los genomas lentivirales (cPPT), inicia la síntesis de una cadena positiva cadena abajo (Charneau *et al.*, 1991, 1992). El segmento de cadena positiva cadena arriba iniciado en el PPT en 3', después de una transferencia de cadena, continúa hasta el centro del genoma y termina después de un suceso de desplazamiento de cadena discreta (figura 6A). Este último suceso por orden cronológico de la transcripción inversa de VIH-1 está controlado por la secuencia de terminación central (CTS), secuencia activa en cis, que expulsa la transcriptasa inversa (RT) de VIH-1 en este sitio en el contexto específico de síntesis por desplazamiento de cadena (Charneau *et al.*, 1994; Lavigne *et al.*, 1997). Por lo tanto, el producto final de la transcripción inversa de VIH-1 es una molécula de ADN lineal que porta en su centro un ADN flap estable de 99 nucleótidos de longitud, denominado en este documento como la triple hélice de ADN central (figura 6A).

Los virus mutantes de iniciación y terminación centrales sintetizan ambos un producto de transcripción inversa desprovisto de una triple hélice de ADN de tipo silvestre. Tal como se representa en la figura 6A, en el caso de un mutante de iniciación central, el producto final es un ADN lineal de doble cadena continuo que carece de la triple hélice central (Charneau *et al.*, 1992). El segmento de cadena positiva cadena abajo iniciado en la cPPT no se sintetiza. Por lo tanto, no se produce ningún desplazamiento de cadena en el centro del genoma; el alargamiento de la cadena positiva transferida continúa a lo largo de todo el genoma. En el caso de un mutante de terminación central, los sucesos de desplazamiento de cadena centrales ya no están controlados por la secuencia CTS mutada, y se generan solapamientos de cadena positiva más largos distribuidos aleatoriamente, en comparación con la triple hélice de ADN de tipo silvestre diferenciada (Charneau *et al.*, 1994). Mutaciones en las secuencias activas en cis cPPT o CTS alteran gravemente la replicación del VIH, sugiriendo un papel directo de la triple hélice central en el ciclo de vida retroviral (Charneau *et al.*, 1992; Hungnes *et al.*, 1992; Charneau *et al.*, 1994).

La presente invención describe el uso de un vector retroviral, que comprende regiones cPPT o CTS de origen lentiviral en el que la LTR se deleciona para el promotor y potenciador de U3, para aumentar *in vitro* la tasa de importación de una secuencia de ácido nucleico contenida en dicho vector en el núcleo de una célula huésped.

La invención también proporciona un vector retroviral, que comprende regiones cPPT o CTS de origen lentiviral y una LTR de origen retroviral deleccionada para el promotor y potenciador de su región U3, para su uso para aumentar la tasa de importación de un ácido nucleico contenido en dicho vector, en el núcleo de una célula huésped, para tratar a dicho huésped.

La presente solicitud describe que la triple hélice de ADN central de VIH-1 está implicada en una etapa tardía de importación nuclear del genoma de VIH-1, inmediatamente antes de, o durante, la translocación de ADN viral a través del poro nuclear. Por lo tanto, las características distintivas de la transcripción inversa lentiviral explican, al menos en parte, la capacidad única de los lentivirus, entre los retrovirus, para replicarse en células que no se dividen. La solicitud también describe que los vectores de transferencia génica de VIH que carecen de la triple hélice de ADN central muestran un defecto de importación nuclear fuerte. Esta solicitud establece que la inserción de las secuencias activas en cis centrales del genoma de VIH-1 en un vector de VIH descrito anteriormente (Naldini *et al.*, 1996) aumenta la eficacia de la transducción complementando el defecto de importación nuclear de ADN del vector original a niveles de tipo silvestre. Este descubrimiento proporciona pruebas adicionales e independientes para el papel de la triple hélice de ADN central en importaciones nucleares VIH-1. La descripción de la triple hélice de ADN como determinante de importación nuclear de lentivirus tiene implicaciones importantes para el diseño de vectores lentivirales eficaces. Dado que la infección por lentivirus de células diana que no se dividen se basa en su uso de una ruta de importación nuclear activa, es preferible mantener los determinantes de importación nuclear lentiviral en construcciones de vector derivadas. Las construcciones de vectores retrovirales convencionales son vectores de sustitución en los que las secuencias de codificación virales completas entre las LTR se delecionan y se sustituyen por las secuencias de interés (Miller AD, 1997). En el caso de vectores lentivirales, esta estrategia convencional conduce a la delección de las secuencias activas en cis centrales cPPT y CTS. El papel importante de la triple hélice en la importación nuclear de VIH implica que dichas construcciones de vector de sustitución no son óptimas. Este descubrimiento establece que el determinante de importación nuclear de triple hélice de ADN es operativo en el contexto heterólogo de un vector lentiviral derivado de VIH-1. La triple hélice de ADN *per se*, fuera del contexto del genoma de VIH-1 nativo, puede estimular la importación nuclear de secuencias de ADN heterólogas (PCT Francia no. 98 05197, 24 de abril de 1998). La presencia de la secuencia de triple hélice de ADN induce un aumento marcado de la eficacia de transducción génica en células madre hematopoyéticas.

La presente solicitud describe ácidos nucleicos (ADN o ARN, o análogos de los mismos) que son capaces de participar en estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice (es decir, ácidos nucleicos de cadena triple). En realizaciones, los ácidos nucleicos son secuencias lentivirales. En realizaciones, los ácidos nucleicos se derivan de secuencias lentivirales, tal como mediante mutagénesis dirigida (es decir, delección, inserción, o sustitución deliberada de al menos un nucleótido) o mutagénesis por presión selectiva. Estos ácidos nucleicos permiten una

transferencia de alta eficacia de ácidos nucleicos a células huésped, y especialmente a núcleos de células huésped. Debido a esta capacidad, los genes que están unidos de forma operativa o físicamente a estos ácidos nucleicos pueden expresarse a niveles altos y/o en un alto porcentaje de células expuestas a los ácidos nucleicos. El ADN insertado en una región de triple cadena de un genoma antiviral es particularmente estable en la construcción, y ayuda a conseguir un nivel alto de transducción y transfección.

La presente solicitud describe una secuencia de ADN de tres cadenas inducida por las regiones cPPT y CTS de un lentivirus, que es capaz de inducir una alta tasa de entrada de ADN vectorial en el núcleo de una célula huésped, o que puede aumentar la tasa de importación nuclear del ADN vectorial. En realizaciones, la secuencia de ADN de tres cadenas puede unirse covalentemente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga, tal como un gen informador o gen de otro interés. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un péptido, polipéptido o proteína. En realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está presente dentro de la región de triple hélice. En realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está presente en el mismo ácido nucleico que la región de triple hélice, pero fuera de la triple hélice. En realizaciones, un único ácido nucleico comprende más de una secuencia de tres cadenas inducida por las regiones cPPT y CTS de un lentivirus.

La presente solicitud describe vectores, tales como vectores lanzadera, vectores de expresión, vectores de integración, transposones, retrotransposones, y similares, que contienen al menos una secuencia capaz de participar en la formación de estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice. En realizaciones, el vector comprende una única secuencia capaz de participar en la formación de estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice. En realizaciones, el vector comprende más de una secuencia capaz de participar en la formación de estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice. Los vectores pueden usarse para transferir los ácidos nucleicos descritos en este documento de una célula a otra, para ayudar en la generación de grandes cantidades de ácidos nucleicos, y para servir como una molécula base en la que pueden insertarse otras secuencias de ácido nucleico de interés (por ejemplo, genes informadores, genes terapéuticos).

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para infectar, transfectar o transducir células eficazmente con una secuencia de ácido nucleico viral que comprende al menos una secuencia que puede participar en estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice. En realizaciones, el método comprende exponer a una célula, o una pluralidad de células, a al menos una copia de un ácido nucleico, vector, virus o célula de la invención. En realizaciones, la etapa de exposición de la célula o células al ácido nucleico, vector, virus o célula de la invención se lleva a cabo en condiciones tales que el ácido nucleico, vector, virus o célula de la invención puede entrar en la célula o células (huésped) diana. En realizaciones preferidas, las condiciones son tales que altos niveles del ácido nucleico, vector, virus, o célula de la invención entran en la célula o células diana.

En realizaciones, el método es muy eficaz, permitiendo la inserción del ácido nucleico descrito en este documento en el núcleo del 30% o más de las células expuestas al ácido nucleico. En realizaciones, el porcentaje de núcleos que captan el ácido nucleico descrito en este documento es del 40% o superior, por ejemplo, el 50% o superior, el 60% o superior, el 70% o superior, el 80% o superior, o el 90%-100%. En realizaciones preferidas, el porcentaje de núcleos que captan el ácido nucleico descrito en este documento es superior al 80%, más preferiblemente, superior al 85% y de la forma más preferible, superior al 90%, tal como superior al 95%. En realizaciones, se infectan o se transfectan las células con virus completos (incluyendo fagos) o bacterias que contienen los ácidos nucleicos descritos en este documento. En realizaciones, se introducen los ácidos nucleicos en las células usando medios mecánicos y/o químicos (por ejemplo, electroporación, fusión de liposomas). En realizaciones, el ácido nucleico desnudo descrito en este documento se es captado por las células huésped diana.

De este modo, en una realización, la invención proporciona el uso de una secuencia de nucleótidos que comprende las regiones cPPT y CTS, que adopta una estructura de ADN de tres cadenas (triple hélice) después de la transcripción inversa, en un vector lentiviral o retrotransposón y que estimula la entrada de, y la tasa de importación nuclear de, el ADN vectorial en el núcleo de la célula transducida.

La solicitud también describe células recombinantes que contienen los ácidos nucleicos o vectores como se describen en este documento. Las células recombinantes pueden ser cualquier célula (eucariota o procariota), incluyendo una progenie o un derivado de las mismas. De este modo, la solicitud incluye células que se crean usando una célula como se describe en este documento. En realizaciones, las células son eucariotas. En realizaciones, las células son células de mamíferos, tales como células HeLa o células hematopoyéticas, tales como células madre hematopoyéticas. De este modo, en realizaciones, la solicitud describe un proceso de transducción de células eucariotas, en el que el proceso comprende el uso de una secuencia de ADN de tres cadenas, inducida por las regiones cPPT y CTS de un lentivirus, que es capaz de introducir una alta tasa de entrada de ADN vectorial en el núcleo de una célula huésped, o capaz de aumentar la tasa de importación nuclear de ADN vectorial.

Dado que las células recombinantes pueden expresar un gen heterólogo de interés a niveles altos, estas células pueden usarse en numerosas aplicaciones. Las aplicaciones incluyen, aunque no se limitan a, la producción de altos niveles de proteínas de interés (tales como proteínas de valor terapéutico) en cultivos celulares y la producción de una proteína de interés *in vivo* mediante introducción de la célula recombinante de la invención en un individuo que

necesita la proteína. El individuo puede ser un animal o un ser humano. Por consiguiente, la solicitud se refiere tanto a aplicaciones veterinarias como a aplicaciones médicas.

5 En realizaciones, la solicitud describe un método de producción de una proteína recombinante de interés exponiendo a una célula diana a un ácido nucleico, vector, o virus de la invención y permitiendo a la célula diana captar el ácido nucleico como se describe en este documento, por ejemplo, a través de la transducción, transformación o transfección. Después de la introducción del ácido nucleico en la célula diana, se cultiva la célula en condiciones en las que la proteína recombinante de interés es expresada, y por lo tanto producida por la célula diana, que se considera ahora una célula recombinante. Aunque el método puede ponerse en práctica en una célula única, 10 individual, es evidente que el método será con frecuencia más práctico si se pone en práctica en una colección de células en las que todas las células son clones. Tal como se usa en este documento, "célula" se refiere a una célula individual o a una colección de células idénticas.

15 El método puede incluir, además, la purificación o el aislamiento de la proteína de interés a partir de la célula recombinante o fluido de cultivo celular. En dicho método, pueden aplicarse los procedimientos de expresión y purificación de proteínas conocidos por los especialistas en la técnica. Estos procedimientos son bien conocidos por los especialistas en la técnica y, por lo tanto, no es necesario explicarlos en detalle en este documento.

20 En una realización preferida, la solicitud describe un proceso para expresar un gen de interés *in vitro*, en el que el proceso comprende: a) exponer a las células diana a un ácido nucleico aislado o purificado que comprende un gen de interés y al menos una copia de las regiones que actúan en *cis* cPPT y CTS de un retrovirus, en el que las regiones cPPT y CTS inducen una estructura de ADN de tres cadenas, en condiciones que permiten la captación del ácido nucleico en la célula diana para generar una célula recombinante, y b) cultivar la célula recombinante en condiciones que permiten que al menos parte del ácido nucleico se transfiera al núcleo de la célula recombinante y se exprese el gen de interés. En realizaciones, el proceso usa un vector como se ha descrito anteriormente. De este modo, la solicitud describe un método de expresión de un gen de interés *in vitro*, por ejemplo, en un cultivo tisular. 25 En realizaciones, el método comprende exponer a células diana a un ácido nucleico, vector, virus o célula de la invención en condiciones en las que la célula diana puede captar la molécula de la invención que contiene el gen de interés. A continuación se permite que la célula recombinante fabricada de este modo se desarrolle y se replique en condiciones en las que se expresa el gen de interés. En realizaciones, el método *in vitro* de expresión génica se acopla a un método de purificación o aislamiento de la proteína de interés. En estas realizaciones, la proteína de interés puede purificarse o aislarse a partir de otros componentes celulares usando técnicas conocidas por los especialistas en la técnica, que incluyen, aunque no se limitan a, cromatografía líquida, precipitación, centrifugado, filtración en gel y cromatografía de afinidad. Las técnicas adecuadas son conocidas por los especialistas en la 30 técnica y no es necesario explicarlas en detalle en este documento.

De este modo, la solicitud describe un método de expresión de un gen de interés *in vivo*, por ejemplo, en un individuo que necesita la proteína expresada por el gen. El método de expresión de un gen *in vivo* comprende preparar una célula recombinante fuera del individuo exponiendo a una célula huésped a un ácido nucleico, vector, virus o célula de la invención, para preparar una célula recombinante de acuerdo con la invención. La célula recombinante de la invención a continuación se administra a, se introduce en, o se expone de otro modo a, el individuo, con lo cual el gen de interés se expresa. Por ejemplo, el método puede comprender administrar una célula recombinante que comprende un ácido nucleico como se describe en este documento a un individuo y permitir que la célula recombinante exprese el ácido nucleico en el cuerpo del individuo. En aplicaciones preferidas, la célula recombinante es una célula madre hematopoyética. Las células recombinantes se purifican o se aíslan en primer lugar a partir de células no recombinantes, a continuación se administran a, se introducen en o se exponen de otra manera a, el individuo. 40

El método de expresión de un gen *in vitro* comprende exponer (por ejemplo, administrar, introducir, etc.) al individuo a un ácido nucleico, vector y/o virus como se describe en este documento. El ácido nucleico, vector y/o virus se transfecta/transduce/infecta al menos una de las células del individuo, con lo cual se expresa el gen de interés. Por ejemplo, el método puede comprender administrar un ácido nucleico, vector o virus de la invención a un individuo en una cantidad y forma suficiente para dar como resultado la expresión del gen de interés en el cuerpo del individuo. Preferiblemente, el método da como resultado la expresión del gen de interés en un tejido o célula diana. 45

55 La solicitud describe un proceso para tratar a un individuo que padece o que tiene una alta probabilidad de desarrollar, una enfermedad o trastorno que tiene una base genética. El proceso comprende administrar un vector retroviral que comprende a) un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica y b) al menos una copia de las regiones que actúan en *cis* cPPT y CTS de un retrovirus, en las que las regiones cPPT y CTS inducen una estructura de ADN de cadena triple, al individuo en una cantidad suficiente para dar como resultado la expresión de la proteína terapéutica en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico, mejorador o curativo. El proceso puede tratar una enfermedad o trastorno sanguíneo, una enfermedad o trastorno cerebral o del sistema nervioso o una enfermedad o trastorno del desarrollo. Las técnicas para introducir y/o expresar genes *in vivo* son conocidas por los especialistas en la técnica. El facultativo puede seleccionar la 60 técnica más adecuada para la proteína dada o el tejido o célula diana.

Por consiguiente, la solicitud describe un proceso de tratamiento de un huésped que comprende el uso de un vector retroviral que contiene una secuencia de ADN de cadena triple inducida por las regiones cPPT y CTS de un lentivirus, que es capaz de inducir una alta tasa de entrada de ADN vectorial en el núcleo de una célula huésped o capaz de aumentar la tasa de importación nuclear de ADN vectorial.

5 La solicitud también describe un kit. El kit puede contener al menos un ácido nucleico, al menos un vector, al menos un virus, o al menos una célula como se describe en este documento, o una combinación de cualquiera o todos éstos. El kit puede proporcionar cada una de las realizaciones anteriores, juntas en una única composición o por separado, tal como por ejemplo, en diferentes recipientes. En realizaciones, el kit incluye algunos o todos los reactivos y suministros necesarios para usar los ácidos nucleicos, vectores, virus, y células con el fin deseado.

10 La presente invención describe un mecanismo original de importación nuclear de VIH-1 con un papel crucial de la estructura de ADN de tres cadenas, la triple hélice de ADN, en este mecanismo. EL VIH-1 ha desarrollado una estrategia de transcripción inversa compleja, mediante la cual un suceso de desplazamiento de cadena central, consecutivo a la iniciación y terminación central de la transcripción inversa, crea una triple hélice de ADN en el centro de las moléculas de ADN de VIH-1 lineal no integradas. Esta triple hélice de ADN actúa, a su vez, como un determinante activo en cis de la importación nuclear del genoma de VIH-1. La invención muestra que la iniciación y terminación central, dos etapas distintivas de la transcripción inversa de VIH-1, explican la capacidad del VIH-1 para infectar células diana que no se dividen.

15 Los ejemplos muestran además que la falta de ADN de triple hélice conduce a un virus que es casi no infeccioso en células que se dividen o que no se dividen. Aunque las mutaciones en cPPT no afectan a la tasa de síntesis de ADN viral o su capacidad para integrarse *in vitro*, la mayoría de las moléculas de ADN retrotranscrito a partir del virus mutante cPPT se acumulan a lo largo del tiempo como ADN lineal no integrado. Por el contrario, el ADN lineal del virus de tipo silvestre se procesa casi completamente en provirus integrados y círculos de ADN. El perfil de ADN intracelular de virus mutantes cPPT apunta a un defecto en la importación nuclear, acumulándose el ADN viral como moléculas lineales como consecuencia de su falta de acceso al compartimiento nuclear en el que podría integrarse o circularizarse. Un defecto tardío de la importación de ADN viral, que afecta de la forma más probable a la translocación a través del NPC, se demuestra mediante el fraccionamiento de células infectadas y visualización directa (FISH) de ADN viral intracelular. Las moléculas de ADN lineales defectuosas en triple hélice se asocian con la membrana nuclear.

20 Los ejemplos se centran en el análisis de virus mutantes cPPT, que se caracterizan por la ausencia de la triple hélice de ADN central. La mayoría de los experimentos presentados en este documento se llevaron a cabo con virus mutantes CTS descritos anteriormente (Charneau *et al.*, 1994), con los mismos resultados (no se muestran los datos). En el virus mutante CTS, la transcripción inversa produce moléculas de ADN lineales que contienen solapamientos de cadenas positivas distribuidos aleatoriamente, más grandes, en comparación con la triple hélice de ADN central discreta del virus de tipo silvestre. De este modo, no solamente la presencia de la triple hélice de ADN, sino también su integridad estructural, es importante para la importación nuclear de ADN de VIH.

25 La invención muestra que la triple hélice de ADN es operativa en el contexto de un sistema de vectores basado en VIH-1. Su inserción en un vector desprovisto de la triple hélice revierte un defecto fuerte de importación nuclear de ADN vectorial hasta niveles de tipo silvestre de importación nuclear.

30 La triple hélice de ADN central es un determinante de importación nuclear común de lentivirus. Se ha definido de forma precisa la localización de la triple hélice de ADN central en el caso de VIH-1. El desplazamiento de cadena central comienza en el primer nucleótido después de la secuencia cPPT (Charneau y Clavel, 1991) y se detiene en general a 99 nucleótidos cadena abajo, en el sitio ter2 (de terminación dos) de la secuencia CTS (Charneau *et al.*, 1994). La configuración tridimensional de las tres cadenas de ADN de la triple hélice aún es desconocida. No obstante, puede generalizarse la presencia de la triple hélice de ADN en el centro del genoma a todos los lentivirus. Una copia central de PPT es una característica común de todos los genomas de lentivirus y un supuesto elemento de terminación de CTS, que se revela mediante la presencia de tractos (A)_n y (T)_n, también existe aproximadamente a 100 nucleótidos cadena abajo (Charneau *et al.*, 1994). Se ha caracterizado recientemente la triple hélice de ADN central del lentivirus de unguados VAIE (Stetor *et al.*, 1999). Una discontinuidad de cadena central en el ADN de virus VISNA, denominado como hueco, pero más probablemente una muesca que resulta de un desplazamiento de cadena central, se reveló mediante una escisión de nucleasa S1 (Harris *et al.*, 1981). Dado que se ha descrito la replicación independiente de mitosis para la mayoría de los lentivirus (Gartner *et al.*, 1986; Thromar, 1963), el papel de la triple hélice de ADN en la importación nuclear descrita en este documento para VIH-1 puede generalizarse a todos los lentivirus.

35 Sin ser limitante, la invención proporciona una hipótesis mecanicista para el papel de la triple hélice de ADN central en la importación nuclear de VIH-1 de la siguiente manera: una estructura de ADN de tres cadenas que actúa como un determinante cis de su importación nuclear es un nuevo fenómeno biológico sin equivalentes virales o celulares conocidos. Cualquier hipótesis de un mecanismo molecular que describe el papel de la triple hélice de ADN central en la importación nuclear de VIH es, por lo tanto, especulativa. La triple hélice central podría actuar como un determinante viral para la iniciación de la captación del filamento de ADN de VIH a través del poro nuclear. Esto

podría conseguirse mediante la interacción directa de la triple hélice de ADN con componentes del poro, o como alternativa mediante la interacción de la triple hélice con proteínas virales o celulares que actúan como lanzadera entre el citoplasma y el núcleo de la célula huésped y que podrían arrastrar al genoma del VIH al interior del núcleo. La translocación del genoma de VIH de 9,7 kb a través de un poro nuclear de diámetro máximo de 26 nm debe producirse en una orientación específica, después del reconocimiento de un extremo del filamento de ADN de VIH-1 para iniciar la captación. Una situación similar surge en la exportación nuclear del ARN mensajero, en la que la captación del filamento de ARN a través del poro se guía mediante la estructura Cap en 5' (Hamm y Mattaj, 1990).

Aunque no se conoce bien la conformación de los PIC de VIH-1, se ha establecido que los extremos del ADN lineal se unen entre sí, probablemente tras la dimerización de las proteínas integrasas unidas a las puntas de las LTR (Miller *et al.*, 1997). De manera interesante, las secuencias activas en cis cPPT y CTS se encuentran en una posición central en todos los genomas lentivirales. Una estructura lógica para los PIC lentivirales es un filamento de ADN doble, plegado simétricamente a cada lado de la triple hélice central mediante la dimerización de la integrasa (figura 6B). La triple hélice constituiría entonces un ápice de un PIC de VIH-1 filamentosos y el dímero de integrasa el ápice opuesto. En PIC mutantes de cPPT, la ausencia de una triple hélice de ADN conduciría a su falta de reconocimiento por la maquinaria del poro nuclear de las proteínas lanzaderas. La identificación de los ligandos proteicos de la triple hélice de ADN central promete ser de vital importancia tanto para entender la importación nuclear de PIC de VIH-1 como para el desarrollo eventual de fármacos cuya diana sea esta etapa de replicación del VIH.

Otra hipótesis mecanicista para explicar las propiedades de virus mutantes de triple hélice implicaría un defecto en la maduración de cápsidas de VIH en PIC, antes de la translocación de ADN viral al interior del núcleo. De acuerdo con este modelo, el ADN viral defectuoso de triple hélice permanecería atrapado como cápsidas virales integrales, incapaces de translocarse. La transcripción inversa retroviral no tiene lugar a altas diluciones de los componentes virales en el citoplasma de células infectadas, sino que requiere el entorno estructural de un complejo de transcripción inversa en el que los componentes están confinados en un conjunto de proteínas de cápsida. El tamaño de la cápsida del VIH excede el diámetro de exclusión máximo de un poro nuclear (Dworetzky *et al.*, 1998; Gelderblom, 1991). Por lo tanto, antes de que el ADN viral pueda entrar en el núcleo, los complejos de transcripción inversa del VIH deben experimentar una maduración a los PIC de tamaño compatible con la translocación a través de los poros nucleares (Karageorgos *et al.*, 1993). La maduración de cápsidas virales antes de la translocación nuclear está bien establecida en varios sistemas virales más en los que el ciclo replicativo implica la translocación del genoma de ADN a través de la membrana nuclear de la célula huésped (Whittaker y Helenius, 1998). Mientras que la transcripción inversa en las cápsidas virales se ha demostrado físicamente para VLM (Bowerman *et al.*, 1999), esto no ha sido aún posible para el VIH-1 debido posiblemente a la fragilidad de las cápsidas de VIH-1 (Barroto-Esoda y Boone, 1991). El complejo de transcripción inversa de VIH contiene varias copias de RT polimerasa (aproximadamente de 30 a 50 por cápsida) (Panet *et al.*, 1975). Debido a la distribución importante de transcriptasa inversa de VIH-1, se necesita una alta estequiometría de enzima con respecto a una plantilla de ARN viral para superar una serie de etapas limitantes de transcripción inversa tales como transferencias de cadena o pausas de polimerización durante la síntesis de cadenas positivas y negativas y formación precisa de la triple hélice central (Klarmann *et al.*, 1993; Charneau *et al.*, 1994). Esto sugiere fuertemente que la terminación central, el último suceso de la transcripción inversa lentiviral, se produce dentro de una estructura de cápsida integral. La terminación central, que marca el fin de la síntesis de ADN viral, podría ser una señal requerida para una descapsidación de ADN viral y su posterior translocación al interior del núcleo.

Estos dos supuestos mecanismos moleculares para la importación nuclear mediada por la triple hélice de ADN de VIH-1 no son mutuamente excluyentes. La formación de una triple hélice de ADN central podría desencadenar la maduración de cápsidas virales a PIC, haciendo de este modo accesible la triple hélice de ADN a las proteínas lanzadera.

El hecho de que se requiera la integridad de la triple hélice de ADN central para la entrada del genoma de VIH-1 en el núcleo de la célula huésped implica que todo el proceso de síntesis de ADN, incluyendo el último suceso de desplazamiento de cadena, se completa antes de la translocación del PIC de VIH a través del poro nuclear. La distribución subcelular de la transcripción inversa lentiviral está debatiéndose actualmente y si la replicación del VIH se produce en un compartimiento celular específico todavía es una pregunta sin respuesta. Basándose en estudios de fraccionamiento, se ha descrito que puede producirse la transcripción inversa del VIH completamente dentro del núcleo de la célula (Bukrinsky *et al.*, 1993a). Sin embargo, las técnicas de fraccionamiento no distinguen entre una localización intranuclear y una asociación con la membrana nuclear. Por el contrario, otros autores han propuesto que la asociación del complejo de transcripción inversa con el citoesqueleto es un prerrequisito para la síntesis de ADN viral (Bukrinskaya *et al.*, 1998). Estudios cinéticos de la síntesis de ADN de VIH-1 y su asociación con la fracción nuclear indican que este último proceso es mucho más rápido que el primero. La síntesis de ADN de VIH-1 en el transcurso de un único ciclo de transcripción inversa sólo alcanza una meseta de 24 a 48 horas después de la infección, mientras que se fracciona más del 95% del ADN de VIH-1 con los núcleos de células infectadas tan pronto como de 4 a 6 horas tras la infección (Barbosa *et al.*, 1994). Por lo tanto, se favorece una tercera posibilidad de que la transcripción inversa lentiviral tenga lugar principalmente en las proximidades inmediatas de la membrana nuclear y los NPC, dentro de la cápsida viral, aunque serán necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

La mitosis celular no proporciona una ruta alternativa para la entrada del ADN viral defectuoso en triple hélice en el interior del núcleo de la célula huésped. Los presentes ejemplos muestran que los virus mutantes de triple hélice central están muy impedidos en su capacidad de replicación no sólo en células diana que no se dividen, sino también en células diana que se dividen. A la inversa, la inserción de una secuencia de triple hélice de ADN en un vector basado en VIH-1 estimula la transducción génica en células tanto que se dividen como que no se dividen. Esto difiere del fenotipo publicado de virus mutantes MA/Vpr, en los que se ha descrito un defecto de replicación exclusivamente en células que no se dividen (Burkinsky *et al.*, 1993b; Heinzinger *et al.*, 1994; von Schwedler *et al.*, 1994). Por lo tanto, los mutantes del VIH MA/Vpr se comportarían como oncovirus dependientes de la mitosis. Una posible explicación para el diferente comportamiento de mutantes de triple hélice centrales es que estos virus carecen de una etapa tardía del proceso de importación nuclear, por consiguiente, las moléculas de ADN deficientes en triple hélice se asocian con la membrana nuclear. Esta asociación estrecha persiste durante la mitosis. El ADN viral mutante puede quedar atrapado dentro de las vesículas de la membrana nuclear mitótica, en las que es incapaz de alcanzar los cromosomas celulares, tal como se ha descrito en el caso de proteínas NLS-LacZ (Bonnerot *et al.*, 1987). Sin embargo, se sabe que las mutaciones en las NLS celulares, que inhiben interacciones con carioferinas inducen la acumulación citoplasmática de la proteína mutada (Kalderon *et al.*, 1984; Lanford y Butel, 1984). Por lo tanto, las mutaciones en las secuencias NLS que contribuyen a las propiedades cariofílicas de los PIC del VIH-1 deben inducir la retención citoplásmica del ADN viral, tal como se ha sugerido anteriormente (Gulizia *et al.*, 1994). Por lo tanto, es posible que los PIC de los virus mutantes MA/Vpr alcancen los cromosomas celulares después de la ruptura de la membrana nuclear durante la mitosis. No obstante, no existe aún ninguna prueba experimental directa para una ruta de importación nuclear dependiente de mitosis de un genoma de ADN lentiviral. Tal como el fenotipo publicado de los virus mutantes MA/Vpr debe observarse con cierta precaución, la misma precaución debe aplicarse a la hipótesis inicial de que una deficiencia de importación nuclear en lentivirus debe conducir a un defecto de replicación exclusivamente en células que no se dividen. Si los lentivirus pueden adoptar una estrategia de importación nuclear dependiente de mitosis, o si la importación nuclear activa de genomas de lentivirus se produce en células tanto que se dividen como que no se dividen, continúa siendo una pregunta sin respuesta.

La presente solicitud describe diseños para vectores lentivirales. Dado que la infección de células diana que no se dividen por lentivirus depende de su uso de una ruta de importación nuclear activa, es importante mantener los determinantes de importación nuclear lentivirales en construcciones vectoriales derivadas. Las construcciones vectoriales retrovirales convencionales son vectores de sustitución en los que todas las secuencias codificantes virales entre las LTR se eliminan y se sustituyen por las secuencias de interés. En el caso de vectores lentivirales, esta estrategia convencional conduce a la delección de las secuencias activas en cis centrales cPPT y CTS. El papel importante de la triple hélice en la importación nuclear del VIH implica que dichas construcciones del vector de sustitución de este tipo no son óptimas. Por lo tanto, la inserción de la triple hélice de ADN del VIH en el vector de sustitución HR GFP (Naldini *et al.*, 1996) potenciaba su eficacia de transducción génica complementando un defecto de importación nuclear del genoma del vector HR a una tasa de importación de ADN próxima a la del VIH-1 de tipo silvestre.

Debe observarse que, aunque los vectores de VIH que carecen de una triple hélice de ADN fueron capaces todavía de la transducción génica (figuras 2C, 2D), la replicación residual de los virus mutados en cPPT está ausente o es extremadamente baja (figuras 6A, 6B). Una posible explicación es que la importación nuclear independiente de la triple hélice podría producirse en el caso de un genoma vectorial pequeño (aproximadamente 4 kb para HR-GFP), pero la presencia de una triple hélice de ADN sería necesaria para la importación del genoma de VIH-1 nativo de 9,7 kb. De hecho, se ha descrito la importación nuclear activa, si bien relativamente ineficaz, de moléculas de ADN de hasta 3 ó 4 kb (Hagstrom *et al.*, 1997).

Las secuencias activas en cis responsables de la formación de la triple hélice de ADN se encuentran en el centro de todos los genomas lentivirales. Esta posición central podría haber evolucionado debido a sus implicaciones estructurales para la conformación de los PIC, en tanto que un plegamiento simétrico de las ramas izquierda y derecha de una molécula de ADN lineal alrededor de la triple hélice podría ser necesario para su captación eficaz a través de los NPC (figura 7B). Si esto es cierto para el virus, entonces una posición central de la triple hélice de ADN también podría ser necesaria para la importación nuclear eficaz de genomas vectoriales.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimientos experimentales.

Células

Las células MT4 son células T CD4+ humanas transformadas con VLTH-1 que permiten la infección del VIH-1 citopática aguda (Harada *et al.*, 1985). Las células H9 son menos permisivas al VIH pero permiten la producción crónica después de la infección. Las células MT4 y H9 se mantuvieron en un medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero fetal de ternero (FCS). Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (PBL) de donantes sanos, estimulados con 1 µg/ml de fitohemaglutinina (Wellcome), y se mantuvieron en presencia de interleuquina-2 (Lymphocult al 10%; Biotest Diagnostics). Se cultivaron células 293T en un medio DMEM suplementado con un 10% de FCS. Las células indicadoras P4 son células HeLa CD4+ que pueden infectarse por el VIH que llevan el gen LacZ

bajo el control de la LTR de VIH-1 (Charneau *et al.*, 1994). Se cultivan células P4 en un medio DMEM suplementado con un 10% de FCS y 500 µg/ml de G418.

Recogida y fraccionamiento de células

5 Se recogieron muestras de sangre de cordón umbilical con el consentimiento informado de las madres. Se purificaron las células CD34+ tal como se ha descrito anteriormente (Robin, C. *et al.*, 1999) usando un sistema de separación de perlas inmunomagnéticas miniMACS (Milteny Biotec). La pureza de las células CD34+ separadas por perlas era superior al 75%. Se purificaron adicionalmente fracciones CD34+CD38lo/- mediante clasificación celular con un FACS Vantage™ equipado con un láser de iones de argón (Becton Dickinson), usando anticuerpos monoclonales murinos (MoAbs) dirigidos contra CD34-PE-Cy5 (Immunotech) y CD38-PE (Becton Dickinson). Las células CD34+ se congelaron en suero fetal de ternero (FCS, célula madre) que contenía DMSO al 10% (Sigma) o se utilizaron inmediatamente.

15 *Construcciones de ADN*

Plásmidos provirales:

20 Se realizó mutagénesis dirigida tal como se ha descrito anteriormente (Kunkel, 1985) en M13mp18 que portaba un inserto de 1,1 kb de *EcoRI* (de 4684 a 5779) del clon molecular infeccioso pLAI3. Los cebadores mutagénicos eran los siguientes:

cPPT-AG 5' pCAATTTTAAAGAAGAGGGGGGAATT 3' (SEC ID Nº 1)

25 cPPT-D: 5' pATTCATCCACAACCTCAAGCGCCGCGGTGGTATTGGGGGTAC 3' (SEC ID Nº 2). pcPPT-AG, pcPPT-D, pcPPT-25 y pCTS se construyeron volviendo a clonar el fragmento de *EcoRI* mutado en pLAI3.

Plásmidos vectoriales:

30 Se obtuvieron plásmidos vectoriales de HR'CMV-LacZ (Naldini *et al.*, 1996). Se sustituyó el gen informador LacZ por el gen EGFP (Clontech). Se amplificó el gen EGFP mediante PCR utilizando Pfu polimerasa (Stratagene) del plásmido pEGFP-N1, añadiendo sitios de restricción de *BamHI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. Los cebadores de PCR eran los siguientes:

35 Bam GFP: 5' CC GGATCC CCA CCG GTC GCC ACC 3' (SEC ID Nº 3)

Xho GFP: 5' CC CTCGAG CTA GAG TCG CGG CCG 3' (SEC ID Nº 4)

40 Se construyó el vector HR GFP volviendo a clonar este fragmento de PCR en los sitios *BamHI* y *XhoI* de pHR'CMVLacZ, sustituyendo el ORF de lacZ por EGFP.

Trip ΔU3 CMV GFP y TRIP ΔU3 PL CMV GFP:

45 En primer lugar, se construyó un subclón que contenía una única LTR y se denominó pUC LTR. El fragmento *KpnI/XbaI* de TRIP GFP que abarca su LTR en 3' se clonó en pUC18. Después, se destruyó el sitio de *EcoRI* rellenando, creando el vector pUC LTR RI-. Se llevó a cabo una PCR divergente en pUC LTR RI- con el objetivo de amplificar todo el plásmido excepto el promotor y el potenciador de la secuencia U3. Los cebadores eran:

50 DU3-: 5' CGGAATTCGGATCCGCGGCCGCATC-GATCTTGCTTCGTTGGGAGTG 3' (SEC ID Nº 5)

DU3+: 5' CGGAATTCAGCCGTCTCGAGAGATGCTGCATATAAGCAGC 3' (SEC ID Nº 6).

55 Los cebadores contienen los sitios de restricción que deben insertarse en lugar de la secuencia del U3 que incluye el sitio *EcoRI* presente en cada cebador. El producto de PCR se digirió con *EcoRI* y después se usó para transformar bacterias competentes. El plásmido construido de este modo se nombró pLTR ΔU3 RI-.

El polienlazador insertado en lugar de la secuencia U3 en pLTR ΔU3 RI- es:

Clal-NotI-BamHI-EcoRI-MluI-XhoI.

60 Se construyó el plásmido TRIPΔU3 PL GFP sustituyendo el fragmento *KpnI/NheI* de TRIP GFP que contenía la LTR en 3' con el fragmento *KpnI/XbaI* de pLTR ΔU3 RI- (los productos de restricción de *NheI* y *XbaI* son compatibles). A continuación se delecionó el polienlazador (PL) de pLTR ΔU3 RI- mediante digestión con *Clal/XhoI* y rellenado.

65 Se construyó el plásmido TRIP ΔU3 GFP intercambiando el fragmento *KpnI/NheI* de TRIP GFP con el fragmento *KpnI/XbaI* de pLTR U3 ΔPL RI-.

Se amplificó un fragmento de 178 pb de pLAI3 (de 4793 a 4971), que abarca cPPT y CTS, mediante PCR. Se añadieron los sitios de restricción de *NarI* en 5' de los cebadores con el objetivo de insertar este fragmento en el único sitio de *ClaI* de HR GFP:

5 *Nar* TRIP+: 5' GTG GTC GGCGCC GAATTC ACAAAT GGC AGT ATT CAT CC 3' (SEC ID N° 7)

Nar TRIP-: 5' GTC GTC GGCGCC CCA AAG TGGATC TCT GCT GTC C 3' (SEC ID N° 8)

10 La inserción de esta secuencia de triple hélice en la orientación correcta dio origen al vector del plásmido TRIP GFP, y TRIPinv GFP en la orientación inversa. Como alternativa, se amplificó el mismo fragmento de triple hélice de los plásmidos pcPPT-AG, pcPPTD, pcPPT-225 y pCTS para generar vectores que incluían las mismas mutaciones en la cPPT o en la CTS como los virus correspondientes.

15 TRIP EF1 α GFP y TRIP Δ U3 EF1 α GFP:

Se substituyó el promotor CMV de TRIP GFP por el promotor EF1 α . En primer lugar se amplificaron la secuencia de triple hélice y el promotor EF1 α por separado, con cebadores solapantes. Se amplificó la secuencia de triple hélice con los cebadores *Nar* TRIP+ y *Mlu* TRIP- en la matriz pLai y se amplificó el promotor EF1 α en la matriz pEFpgkneo con los cebadores *Mlu* EF1+ y *Bam* EF1-.

20 *Nar* TRIP+: 5' GTC GTC GGCGCC GAATTC ACAAAT GGC AGT ATT CAT CC 3' (SEC ID N° 9)

*Mlu*TRIP-: 5' AGC CTC ACG ACGCGT AT CAG CCAAAG TGG ATC TCT GCT G 3' (SEC ID N° 10)

25 *Mlu* EF1+: 5' CTG AT ACGCGT CGT GAG GCTCCG GTG 3' (SEC ID N° 11)

Bam EF1-: 5' CG GGATCC TGT GTT CTG GCGGCA AAC3' (SEC ID N° 12)

30 A continuación, se realizó una segunda ronda de PCR en una mezcla de los dos primeros productos de PCR, usando los cebadores externos *Nar* TRIP+ y *Bam* EF1-. La secuencia de triple hélice y el promotor EF1 α se adhirió conjuntamente mediante esta técnica.

35 Se construyó el plásmido TRIP EF1 α GFP substituyendo el fragmento *EcoRI/BamHI* de TRIP GFP que contenía la secuencia de triple hélice y el promotor CMV por el producto de PCR TRIP EF1 α digerido con *EcoRI/BamHI* (el cebador *Nar* TRIP+ posee un sitio *EcoRI* en su extremo 5').

40 Para construir el plásmido TRIP Δ U3 EF1 α GFP, se insertó el fragmento *EcoRI/BamHI* de TRIP EF1 α GFP que contenía la secuencia de triple hélice y el promotor EF1 α en TRIP Δ U3 GFP en lugar del fragmento *EcoRI/BamHI* que contenía la secuencia de triple hélice y el promotor CMV.

Producción de virus y vectores

45 Para las investigaciones descritas en las figuras 1-6, se produjeron los virus mediante una transfección transitoria de células HeLa mediante la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio. Se produjeron partículas de vector mediante co-transfección transitoria de 293T mediante el plásmido vectorial, un plásmido de encapsidación (p8.2) y un plásmido de expresión de la envuelta del VEV (pHCMV-G, (Yee *et al.*, 1994)), tal como se ha descrito anteriormente (Naldini *et al.*, 1996). Todos los sobrenadantes de virus y de vectores se trataron con ADNasal (1 μ g/ml en presencia de MgCl₂ 1 μ M) durante 15 minutos a 37°C.

50 *Producción de partícula vectorial lentiviral*

55 Para las investigaciones descritas en las figuras 7-9, se produjeron los virus mediante co-transfección transitoria de 293T mediante el plásmido vectorial, un plásmido de encapsidación (p8.2) y un plásmido de expresión de la envuelta de VEV (pHCMV-G, (Yee *et al.*, 1994)), tal como se ha descrito anteriormente (Naldini *et al.*, 1996). Todos los sobrenadantes de virus y vectores se trataron con ADNasal (1 μ g/ml en presencia de MgCl₂ 1 μ M) durante 15 minutos a 37°C.

Valoraciones de virus y vectores

60 Para las investigaciones descritas en las figuras 1-6, se realizó una valoración de un ciclo de virus por triplicado mediante la infección de células P4 sembradas en placas de 96 pocillos, con cantidades equivalentes de partículas (1 ng de antígeno viral p24 por pocillo), en presencia de DEAE-dextrano 20 μ M. Se añadió el inhibidor de proteasa Saquinavir (Roche) (1 μ M) durante todo el experimento, para limitar el análisis a un único ciclo de infección. Se inhibió la mitosis celular mediante tratamiento con aficolina (8 μ M), el día antes de la infección. Se midió la actividad de la β -galactosidasa 48 horas después de la infección usando un ensayo con gen informador β -Gal

65

quimioluminiscente (Boehringer).

Se infectaron células HeLa por triplicado con cantidades equivalentes de partículas vectoriales (5 ng de P24 por pocillo). Se cambió el medio 48 horas después de la transducción por 200 μ l de TNB (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) y se cuantificó la fluorescencia de células vivas utilizando un fluorímetro de microplacas (Victor², Wallac) y filtros adaptados EGCP (excitación: 485 nm, emisión 520 nm).

Protocolo de transducción

Para las investigaciones descritas en las figuras 7-9, se recubrieron placas de cultivo tisular de 24 ó 96 pocillos con fibronectina (Bio-Whittaker Europe) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sembraron en placa poblaciones de CD34+ humanas, inmediatamente después de la purificación o descongelación, a de 2 a 3 x 10⁵ células/ml en un medio libre de suero (IMDM que contenía α -tioglicerol 11,5 μ M, BSA al 1,5% (ambos de Sigma), lípidos sonicados y transferrina humana saturada con hierro) o α -MEM que contenía FCS al 10% en presencia de 4 μ g/ml de polibreno (Sigma) y 4 citoquinas humanas (hu) recombinantes (r): Factor celular de células madre rhu (SCF, 100 ng/ml, proporcionado por Amgen), ligando Flt3 (FL, 100 ng/ml, Diaclone), IL-3 (60 ng/ml, Sandoz), y factor de diferenciación y crecimiento de megacariocitos rhu pegilados (PEG) (MGDF) (10 ng/ml, Amgen), y virus lentiviral concentrado a la concentración de 100 ng de P24 viral/ml durante 24 horas. A continuación, se lavaron y cultivaron las células en condiciones linfomioides (en placas de cultivo tisular recubiertas previamente con células MS5 en RPMI suplementado con suero humano al 10%, FCS al 5% y las siguientes 7 citoquinas: rhu-SCF (50 ng/ml), rhu-FL (50 ng/ml), PEG-rhu-MGDF (50 ng/ml), rhu-IL-3 (10 ng/ml), rhu-IL-2 (5 ng/ml), rhu-IL-15 (10 ng/ml), y rhu-IL-7 (20 ng/ml) (siendo las tres IL de Diaclone) durante 48 horas. A continuación, se evaluó la expresión de eGFP en la fracción de células CD34+ usando un MoAb CD34-PE-Cy5 (Immunotech). Se realizó el análisis en un aparato FACS Scan usando el software Cellquest (Becton Dickinson).

Ensayos de cultivo a largo plazo (LTC) y clonogénico

Se sometieron a ensayo progenitores clonogénicos de células CB recientes humanas en metilcelulosa al 0,8% que contenía FCS al 30%, BSA desionizado al 1%, y 2-mercaptoetanol 10⁻⁴M, en presencia de 50 ng/ml de rhu-SCF, 10 ng/ml de rhu-GCSF (Amgen), 2 ng/ml de rhu-IL3, y 2 U/ml de rhu-EPO (Amersham). Se sembraron en placas células de médula ósea (BM) de ratones NOD-SCID injertados en presencia de rhu-SCF, -IL-3, -EPO, y -GM-CSF (10 ng/ml) tal como se ha descrito (Pflumio, F. *et al.*, 1996). Se valoraron los progenitores en el día 14-16 según los criterios ya descritos anteriormente (Croisille L. *et al.*, 1994) y se observó la expresión de EGFP mediante microscopía fluorescente usando un microscopio Nikon Eclipse TE300. Se realizó cultivo a largo plazo (LTC) tal como se ha descrito anteriormente (Issaad C. *et al.*, 1993) tanto en dilución limitante en placas de 96 pocillos usando el FACS Vantage equipado con un ACDU (BD) como en un cultivo en masa en placas de 24 pocillos que contenían una capa confluyente de la línea celular MS5 del estroma murina. Después de 5 a 10 semanas, se recogieron las células adherentes y no adherentes y se sembraron en placas para el ensayo clonogénico. Tanto para los ensayos clonogénicos como LTC-IC, se escogieron las colonias individualmente y se congelaron antes del análisis de PCR.

Análisis por PCR

Se realizó el análisis por PCR en ADN genómico obtenido de colonias derivadas de progenitores clonogénicos o de clones desarrollados en cultivos linfomioides. Se lisaron las células y se digirieron las proteínas en 20 μ l de tampón que contenía proteinasa K (10 μ g/ml), KCl (50 mM), Tris-HCl (10 mM, pH 8,3), MgCl₂ (2,5 mM), gelatina (0,1 mg/ml), NP40 (0,45%), y Tween 20 (0,45%). Se llevó a cabo la amplificación de ADN genómico con el cebador sentido

5' CCCTCGAGCTAGAGTCGCGGCCG 3' (SEC ID N° 13) y el cebador antisentido

5' CCGGATCCCCACCGGTGCCACC 3' (SEC ID N° 14) a la temperatura de hibridación de 62°C. La amplificación dio como resultado un producto de 800 pb.

Análisis de ADN vectorial y viral

Se infectaron células P4 o MT4 a una alta multiplicidad de virus (150 ng de p24 por 10⁶ células) o se transdujeron mediante vectores (25 ng de p24 por 10⁶ células), en presencia de 20 μ g/ml de DEAE-dextrano en el caso de células P4. Se extrajo el ADN de células infectadas o transducidas en diferentes momentos, se restringió y se analizó mediante transferencia de Southern. En todos los casos, se eliminó el ADN plasmídico bacteriano contaminante del análisis mediante digestión mediante *DpnI*. Se digirió el ADN de células infectadas mediante *MscI* y *XhoI* y el ADN de células transducidas mediante *EcoNI*, *Avall* y *XhoI*. Después de la electroforesis y la transferencia de 10 μ g de ADN digerido, se hibridaron las membranas con sondas de ADN marcadas con [³²P] cebadas aleatoriamente (Rediprime II, Amersham). Se amplificó la sonda de ADN específica de virus mediante PCR a partir de una plantilla de plásmido pLAI3 usando los siguientes cebadores:

5Msc: 5' AGA AGA AAT GAT GAC AGC ATG 3' (SEC ID N° 15)

3Msc: 5' TGC CAG TTC TAG CTC TG 3' (SEC ID N° 16).

El fragmento de ADN de 1680 pb resultante (desde la posición 1818 hasta 3498 de pLAI3) se solapa con el sitio de restricción de *MscI* en la posición 2655 de los genomas virales.

5 Se sintetizó la sonda vectorial mediante PCR en pTRIP GFP con los cebadores:

5EcoNI: 5' CAG GGA CTT GAA AGC GAA AG 3' (SEC ID N° 17)

10 3EcoNI: 5' GCT TGT GTA ATT GTT AAT TTC TCT GTC 3' (SEC ID N° 18)

La sonda vectorial es un fragmento de 1027 pb (desde la posición 649 hasta la 1676 de pTRIP GFP) y se solapa con el sitio de *EcoNI* en la posición 1156 de los genomas vectoriales.

15 Para ensayar la cantidad de ADN retrotranscrito a partir del tipo silvestre y virus PPT-AG y cPPT-D, se siguió un protocolo similar excepto que el ADN extraído a las 12 horas después de la infección se restringió mediante *MscI* y *DpnI*. La sonda usada para la hibridación era el fragmento interno *MscI* de 1,9 kb de pLAI3. Se cuantificaron las señales de hibridación usando un sistema phosphorimager (Molecular Dynamics) y el software ImageQuant.

20 *Hibridación in situ*

Se infectaron células P4 a alta multiplicidad (2 µg de antígeno p24 de cada virus por 10⁶ células), en presencia de 20 µg/ml de DEAE-dextrano. A las 24 horas después de la infección, se tripsinizaron las células, se lavaron exhaustivamente (para eliminar partículas virales adsorbidas en la membrana plasmática), y se volvieron a sembrar en placas sobre portaobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Las células se cultivaron durante 48 horas más y se fijaron en PFA al 4%/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células en PBS y se permeabilizaron con Triton al 0,5%/Saponina al 0,5% en PBS, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se trataron las muestras deshidratadas con ARNasa A (200 µg/ml en 2X SSC), una hora a 37°C y mediante proteinasa K (6 µg/ml en PBS), aproximadamente 5 minutos. Se desnaturalizaron las muestras mediante incubación en formamida desionizada al 70%/2X SSC durante 2 minutos a 70°C seguido de formamida desionizada al 30%/2X SSC durante 2 minutos a 70°C. Se realizaron las hibridaciones durante una noche a 37°C usando un plásmido pLAI3 biotinilado con traducción a partir de muescas (formamida desionizada al 50%, sulfato de dextrano al 10%, 10 µg/ml de ADN de esperma de salmón, Tween 20 al 0,1% en 2X SSC). Se lavaron exhaustivamente las muestras (lavados sucesivos en 2X SSC/formamida al 50% a temperatura ambiente y después a 50°C). Se llevó a cabo la detección de las sondas hibridadas usando el kit *Tyramid-Streptavidin TSA-Direct kit* (NEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante

Ejemplo 2: *La iniciación central de la transcripción inversa es una etapa esencial del ciclo de replicación del VIH-1*

40 En trabajos anteriores, se demostró que las mutaciones conservativas en las secuencias cPPT y CTS alteraban gravemente la replicación de virus (Charneau *et al.*, 1992; Hungnes *et al.*, 1992). Un virus mutante de iniciación central (cPPT-225) y un virus mutante de terminación (CTS) mostraron una infectividad reducida cuatro y diez veces respectivamente en una ronda de experimentos de valoración. Para inactivar la función de la cPPT, se introdujeron mutaciones semiconservativas en la región codificante solapante de la integrasa. En el virus mutante cPPT-D, el cambio de lisina por arginina en la posición 188 permitió la introducción de un total de 10 mutaciones en la secuencia de 19 nucleótidos del cebador de PPT (figura 1A) (Huber y Richardson, 1990). El efecto de este cambio de aminoácidos en la replicación de virus se comprobó mediante la construcción del virus mutante cPPT-AG de control, en el que una única mutación de purina por purina, respetando la naturaleza de polipurina de la cPPT, inducía el mismo cambio de aminoácidos. La presencia de una triple hélice de ADN en ADN de virus cPPT-AG y de tipo silvestre retrotranscritos, y su ausencia del ADN de virus cPPT-D, se confirmó mediante escisión por S 1 nucleasa de ADN de Hirt a partir de células infectadas tal como se ha descrito anteriormente (Harris *et al.*, 1981; Charneau y Clavel, 1991).

55 Se evaluó en primer lugar la infectividad de virus en experimentos de replicación cinética convencionales en cultivos celulares. Se infectaron los linfocitos de la sangre periférica (PBL) estimulados con PHA y células MT4 con cantidades iguales de partículas virales, normalizadas de acuerdo con el contenido de proteína de la cápsida (p24) de los sobrenadantes virales, y se realizó un seguimiento a lo largo del tiempo de la actividad de la transcriptasa inversa en sobrenadantes de cultivos (figura 1B). Las curvas de crecimiento de virus VIH-1 LAI de tipo silvestre y cPPT-AG de control eran similares en ambos sistemas celulares. El hecho de que la mutación de K188R se produce de manera natural en algunos aislados de VIH-1, ya había sugerido que tiene poco o ningún efecto sobre las funciones de la integrasa y PPT. Por el contrario, cuando se infectaron PBL con el virus mutante cPPT-D, no se detectaba ninguna replicación durante los 15 días del cultivo. Lo mismo ocurría para células MT4, a pesar de su alta susceptibilidad a la infección por el VIH. El virus mutante cPPT-D tampoco fue infeccioso en líneas celulares inmortalizadas tales como H9 o CEM (no se muestran los datos).

65

Se analizó cuantitativamente la infectividad de virus mediante valoraciones basadas en una única ronda de replicación (figura 1C). Se infectaron las células indicadoras P4 (HeLa CD4 LTR-LacZ) (Charneau *et al.*, 1994) con cantidades equivalentes de partículas virales de diferentes virus. Estas valoraciones de un ciclo confirmaron la pérdida casi total de infectividad del virus mutante cPPT-D. En células P4, la infectividad del control de cPPT-AG era idéntica a la del virus de tipo silvestre, mientras que la infectividad del mutante cPPT-D se reducía fuertemente, a niveles próximos al trasfondo. Se obtuvieron los mismos resultados en células P4 que no se dividen tratadas con afidicolina (figura 1C, panel derecho).

Estos descubrimientos sugieren fuertemente que la iniciación central de la transcripción inversa es necesaria para la replicación de VIH en células que no se dividen así como en células que proliferan.

Ejemplo 3: *La producción de virus no resulta afectada por mutaciones en cPPT*

Se comprobó que las diferentes mutaciones introducidas en los provirus de plásmidos cPPT-D y cPPT-AG no afectaban a las etapas finales del ciclo de replicación. Se cuantificó la producción de virus, de acuerdo con el contenido de P24 de los sobrenadantes, después de transfecciones transitorias de células HeLa mediante plásmidos provirales. Se descubrió que la producción de virus mutantes de cPPT no era significativamente diferente de la del virus de tipo silvestre (figura 2A). Por lo tanto, la mutación K188R no afecta a la fase tardía de la replicación del VIH-1. Por lo tanto, la etapa defectuosa implicada en el fenotipo del virus mutante cPPT-D debe preceder a la expresión de ADN viral y pertenecer a la fase temprana del ciclo de replicación del VIH.

Ejemplo 4: *Las mutaciones en el cPPT no afectan a la tasa de transcripción inversa del genoma de VIH-1*

El efecto de las mutaciones en c-PPT sobre la síntesis de ADN viral se evaluó cuantificando el ADN sintetizado en una única ronda de retrotranscripción (figura 2B). Se detectó un fragmento de restricción de *MscI* interno del ADN viral de células infectadas mediante transferencia de Southern y se cuantificó, usando el correspondiente fragmento de ADN de *MscI* como sonda. Dado que el fragmento de *MscI* interno es común al ADN proviral integrado y las moléculas lineales y circulares no integradas, su cuantificación refleja la cantidad total de ADN viral, independientemente de su estado integrado o no integrado. Para limitar el análisis al primer ciclo de transcripción inversa, se recogió el ADN de células P4 infectadas 12 horas después de la infección, antes de la iniciación de una segunda ronda de infección. La cantidad total de ADN retrotranscrito en un único ciclo de transcripción inversa era la misma después de la infección con el mutante cPPT-D, control de cPPT-AG o virus de tipo silvestre. Estos experimentos mostraron que, aunque las mutaciones en cPPT suprimen la replicación del virus, no afectan a la tasa de síntesis de ADN. El defecto de replicación de virus mutantes cPPT implica una etapa posterior a la síntesis de ADN viral.

Ejemplo 5: *La carencia de una triple hélice de ADN central no afecta a la integración in vitro de los PIC de VIH-1*

Se comparó la capacidad de integración *in vitro* de los PIC del VIH-1 de tipo silvestre y los mutantes de iniciación centrales (figura 2C) usando un ensayo de integración *in vitro* cuantitativo tal como se describió por Farnet (Farnet y Haseltine, 1990), con modificaciones secundarias. Dado que los complejos de replicación del VIH-1 residen solo transitoriamente en el citoplasma de células recién infectadas (Barbosa *et al.*, 1994), la preparación de cantidades suficientes de PIC de VIH requiere infección masiva y fraccionamiento celular en un plazo de 4 a 6 horas. Esto se logró mediante el co-cultivo de células H9 infectadas de forma crónica por el virus de tipo silvestre o cPPT-225 y células diana HUT78 no infectadas. Se seleccionó el virus mutante cPPT-0225 (figura 1A) para estos experimentos en lugar del cPPT-D no infeccioso, que es incapaz de establecer una infección crónica. La infectividad residual del virus mutante cPPT-225 es baja, pero suficiente para permitir que se propague lentamente en cultivos celulares (Charneau *et al.*, 1992).

Se aislaron PIC de VIH del citoplasma de células infectadas y se incubaron en presencia de ADN diana plásmido Bluescript linealizado. Se reveló la integración mediante la presencia de un fragmento de 12,7 kb, reactivo frente a la sonda de VIH-1, correspondiente al tamaño esperado del genoma de VIH lineal de 9,7 kb integrado en el ADN diana de 3 kb.

La cantidad de ADN lineal integrado en el ADN plasmídico no se diferenciaba entre el virus de tipo silvestre y el mutante cPPT 225 (figura 2C). Por tanto, los PIC de VIH-1 del mutante cPPT conservaban su capacidad completa para integrarse *in vitro*. La etapa de replicación defectuosa de los virus mutantes de la triple hélice de ADN central debe encontrarse, después de la transcripción inversa pero antes de la integración de su genoma de VIH en la cromatina de la célula huésped.

Ejemplo 6: *Importación nuclear alterada de virus mutantes de triple hélice de ADN central*

Los experimentos anteriores sugerían que el defecto de replicación de los virus mutantes de triple hélice de ADN central estaba relacionado con el acceso de los PIC de VIH a la cromatina de la diana celular. Por lo tanto, se ensayó la hipótesis de un defecto de importación nuclear de ADN de virus mutantes cPPT. Los estudios sobre la importación nuclear de PIC de VIH-1 estaban obstaculizados por una carencia de un ensayo reproducible y

cuantitativo para la importación nuclear a nivel del ADN viral. Una vez que se retrotranscribió en el citoplasma, el ADN lineal retroviral se importa dentro del núcleo donde se integra o se circulariza. Los círculos de ADN retroviral no integrados, que contienen una o dos LTR, se encuentran exclusivamente dentro del núcleo y, por lo tanto, representan marcadores convenientes de la importación nuclear de ADN viral. Para evaluar la importación nuclear de ADN de VIH, los estudios anteriores usaban amplificación por PCR de dos círculos de ADN de LTR no integrados. Sin embargo, tal como se ha descrito en el presente documento y por Barbosa *et al.*, (1994), debido a que círculos de dos LTR representan una fracción mínima del ADN de VIH en células infectadas, su detección es muy sensible a alteraciones menores de la fisiología celular o de la infectividad del virus. Por lo tanto, se diseñó un ensayo novedoso que permite un seguimiento cuantitativo de la síntesis, circularización e integración de ADN de VIH mediante transferencia de Southern.

En resumen, se prepara el ADN de células infectadas en diversos momentos y se digiere con *MscI*, una enzima de restricción que corta el genoma de VIH-1 dos veces. Usando una sonda de ADN generada por PCR que se solapa exactamente con el sitio de *MscI* en 5', se revelan varias bandas específicas (figura 3A). El fragmento de *MscI* interno de 1,9 kb es común a todas las especies de ADN virales independientemente de su estado integrado o no integrado y la cuantificación de esta banda indica la cantidad total de ADN viral en células infectadas. Una banda de 2,6 kb corresponde al fragmento de *MscI* en 5' distal de ADN de VIH lineal no integrado. Para minimizar el sesgo de transferencia debido al gran tamaño de los fragmentos específicos de círculos de ADN, el ADN se corta adicionalmente con *XhoI*. ADN circular de una o dos LTR aparece a continuación en bandas de 2,8 y 3,4 kb respectivamente. Dado que la sonda de ADN se solapa exactamente con el sitio en 5' de *MscI*, la intensidad de cada banda es directamente proporcional a la cantidad de especies de ADN viral correspondientes. Se calcula la cantidad de ADN proviral integrado sustrayendo de la cantidad total de ADN viral las señales de ADN virales circulares y lineales no integrados. Se llevó a cabo una cuantificación paralela de la misma población de células infectadas después de un fraccionamiento de Hirt para separar ADN viral no integrado de bajo peso molecular de ADN proviral integrado de alto peso molecular. Esto originó idénticos resultados, validando de este modo el cálculo mediante etapa de sustracción.

Tal como se ha indicado mediante la cinética de acumulación de ADN viral total (fragmento interno de 1,9 kb), la síntesis de ADN viral continuaba durante de 24 a 48 horas después de la infección, reflejando un proceso de infección asíncrono. Las cantidades de ADN viral total de virus mutantes cPPT-AG y cPPT-D eran similares a aquellas del VIH-1 de tipo silvestre. Como anteriormente, las mutaciones en cPPT no influyeron sobre la tasa de síntesis de ADN. Cantidades detectables de ADN lineal no integrado de longitud completa estaban presentes en células tan sólo 6 horas después de la infección (figura 3B). Los círculos de ADN y provirus integrados se detectaron por primera vez 12 horas después de la infección. La integración y circularización continuó hasta su terminación durante 36 horas más.

Una vez completado un ciclo de infección, en el caso del virus de tipo silvestre, se había integrado aproximadamente el 55% de ADN viral en el ADN de la célula huésped, aproximadamente el 35% se había circularizado en un círculo de LTR, y una pequeña fracción de menos del 10% permaneció en la forma de ADN lineal no integrado estable (figura 3c). Notablemente, estuvo presente ADN circular de dos LTR sólo en cantidades residuales, aunque detectable 48 horas después la infección. Se trató el ADN del virus de control cPPT-AG de una manera muy similar al ADN del virus de tipo silvestre.

En el caso del virus mutante cPPT-D, una alteración marcada en el patrón de ADN viral intracelular era evidente, con una acumulación clara y repetida de moléculas lineales no integradas. 48 horas después de la infección, solo se habían generado cantidades muy pequeñas de ADN circular de una LTR y de ADN proviral integrado y más de un 90% del ADN mutante de cPPT-D permaneció bloqueado en forma lineal no integrada (figura 3C).

Se espera que un defecto de importación nuclear disminuya la proporción de especies de ADN virales nucleares (provirus integrados y círculos de una o dos LTR) y que aumente de forma concomitante la proporción de moléculas de ADN lineales que no se translocan. Por lo tanto, el perfil de ADN intracelular de virus mutante cPPT-D sugiere fuertemente un defecto de importación nuclear de ADN viral.

Ejemplo 7: *El ADN lineal de virus mutantes de triple hélice de ADN central se acumula en las proximidades de membrana nuclear*

Para caracterizar adicionalmente el defecto de importación nuclear de virus mutantes de triple hélice de ADN central, se abordaron las cuestiones de si las moléculas de ADN lineal mutado se acumulaban en un compartimento subcelular particular. El proceso de importación nuclear puede dividirse en dos fases principales, el acoplamiento del componente nuclear a la membrana nuclear y su translocación a través del complejo de poro nuclear (NPC). Se realizó en primer lugar el fraccionamiento convencional de núcleos/citoplasma de células infectadas, seguido por la detección del ADN viral mediante transferencia de Southern. Se asoció la totalidad de ADN viral de todos los virus con los núcleos de células P4 infectadas, 24 horas después de la infección (figura 4A), lo que sugería que el acoplamiento de ADN del VIH a la membrana nuclear no resultaba afectado por la carencia de triple hélice de ADN central.

Para confirmar que las moléculas de ADN deficientes en triple hélice central se acumulan en la membrana nuclear, se usó hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para visualizar directamente la ubicación intracelular de genomas del VIH. Se infectaron células P4 a multiplicidad alta en condiciones de un ciclo, se hibridaron con una sonda de genoma del VIH-1 de longitud completa, y se observaron mediante microscopía de deconvolución. Se descubrieron puntos específicos de forma predominante dentro del núcleo en el caso de virus de tipo silvestre y cPPT-AG de control (figura 4B). Dado que la FISH no puede distinguir entre las diferentes especies de ADN del VIH, estas moléculas de ADN viral intranucleares podían ser provirus integrados o círculos de ADN no integrados. Se asociaron algunos genomas poco frecuentes con la membrana nuclear y probablemente representaron el ADN lineal residual detectado mediante transferencia de Southern al mismo tiempo después de la infección. Otros puntos asociados con la membrana plasmática se derivaban posiblemente de las partículas defectuosas adsorbidas en la membrana que contenían genomas parcialmente retrotranscritos (Lori *et al.*, 1992). Por el contrario, los genomas de VIH se localizaban mayoritariamente en la membrana nuclear y estaban casi completamente ausentes del núcleo en el caso del virus mutante cPPT-D. Dado que el perfil de ADN de transferencia de Southern indicaba que se bloqueó prácticamente todo el ADN de cPPT-D en la forma lineal, puede suponerse que estos genomas del VIH asociados con la membrana nuclear eran moléculas de ADN lineal no integrado. Esta visualización directa de moléculas de ADN viral en células infectadas confirmaba la asociación del ADN viral de mutantes de triple hélice central con la membrana nuclear.

Los experimentos de FISH realizados sugieren que los virus mutantes cPPT son defectuosos en la translocación de su genoma a través de los NPC. Sin embargo, la demostración clara de un defecto de translocación, mediante localización de ADN viral mutante en el lado citoplasmático de los NPC, no es accesible mediante experimentos de FISH.

En conjunto, se concluye a partir de estos resultados que la triple hélice de ADN central del VIH-1, creada mediante etapas de iniciación y terminación central durante la transcripción inversa, es importante para que los PIC del VIH-1 entren en el núcleo de la célula huésped. En ausencia de triple hélice de ADN, se altera gravemente la importación nuclear de ADN viral en una fase inmediatamente anterior o durante la translocación de ADN del VIH-1 a través del poro nuclear.

Ejemplo 8: *Impacto de la triple hélice de ADN central sobre la transducción génica mediante un sistema vectorial basado en VIH-1*

Habiendo identificado la triple hélice de ADN central como un determinante clave para la importación nuclear de VIH-1, se ensayó el efecto de insertar las secuencias activas en cis centrales de VIH-1 en el vector HR de VIH-1 descrito anteriormente (Naldini *et al.*, 1996) (figura 5A). Para monitorizar la transducción génica, se insertó además un gen que codificaba la proteína verde fluorescente (GFP). El vector que contenía una secuencia de triple hélice de ADN se llamó TRIP GFP. Los controles incluían construcciones similares con cPPT o CTS mutados y una región central de tipo silvestre insertada de orientación inversa, no funcional (TRIP_{inv} GFP). La presencia de una triple hélice de ADN en ADN vectorial TRIP GFP retrotranscrito, y su ausencia en HR GFP, TRIP_{inv} GFP y de vectores que contenían una versión mutada de la secuencia de triple hélice central, se confirmó mediante escisión por S1 nucleasa de ADN de Hirt aislado de células transducidas.

El número de partículas vectoriales producidas por transfección transitoria se normalizó antes de la transducción de acuerdo con los niveles de proteína de la cápsida (p24), actividad de transcriptasa inversa y la cantidad de ARN vectorial genómico en sobrenadantes de células transfectadas. Se obtuvo producción similar de los diversos vectores, con una relación lineal entre los tres criterios de normalización (no se muestran los datos). Por lo tanto, la inserción de la región central del genoma del VIH-1 en el vector HR no tuvo influencia sobre la tasa de encapsidación de ARN genómico. Se transdujeron células HeLa que pueden dividirse y que no pueden dividirse (tratadas con afidicolina), con cantidades equivalentes de partículas vectoriales HR-GFP o TRIP-GFP y se monitorizó la expresión de GFP 48 horas después mediante cuantificación de la fluorescencia. Se calculó la pseudotransducción de actividad de GFP debida a la administración directa de proteínas GFP a células diana mediante las partículas vectoriales de fusión a partir de la transducción de células tratadas con un inhibidor de RT de VIH-1 (nevirapina 1 μ M, Boehringer Ingelheim) y se sustrajo este trasfondo de la señal de fluorescencia. Se eliminó la fluorescencia no específica debida a la transfección secundaria provocada por el co-precipitado de ADN con calcio/fosfato en los sobrenadantes de vector tratando al vector madre con ADNasa I antes de la transducción.

En estas condiciones, la presencia de la secuencia de triple hélice en el vector del VIH aumentaba la transducción de GFP en células HeLa más de diez veces (figura 5B). Se observó una potenciación similar de la transducción génica en otras líneas celulares diana tales como MT4 o 293T (no se muestran los datos). Este efecto se perdía si se insertaba la secuencia de triple hélice en orientación inversa (figura 5B) o mutada en la cPPT (no se muestra).

Ejemplo 9: *La presencia de una triple hélice de ADN en los vectores de VIH-1 aumenta la tasa de importación nuclear de genoma vectorial hasta niveles de tipo silvestre*

A continuación era interesante determinar si el aumento de la fluorescencia de GFP inducida por inserción de una secuencia de triple hélice en el vector del VIH se debía a su efecto sobre la importación nuclear del ADN vectorial.

Para abordar esta cuestión, se adaptó el ensayo de transferencia de Southern cuantitativa para detectar ADN viral intracelular al sistema de vectores. El ADN de células transducidas con vector se digirió con *Eco*NI y *Av*II para producir un fragmento de 0,8 kb interno, y con *Xho*I. Usando una sonda de ADN generada por PCR que se solapaba exactamente con el sitio de *Eco*NI, se esperaron señales específicas para el genoma de vector lineal no integrado, y para círculos de ADN de una y de dos LTR a 1,2 kb, 1,4 kb y 2 kb, respectivamente. Se analizó el procesamiento del ADN vectorial en diversos puntos temporales después de la transducción de células HeLa.

La cantidad total de ADN vectorial sintetizado en células transducidas era comparable para vectores que contenían o carecían de triple hélice de ADN (figura 5C). Una vez más, la inserción de secuencias de cPPT y CTS, en cualquier orientación, en el vector HR no influyó sobre la tasa de transcripción inversa de su genoma. Después de la cuantificación mediante phosphorimager, se descubrió que el destino intracelular del ADN de vectores HR-GFP y TRIPinv-GFP (figura 5D) se asemejaba estrechamente al del ADN de virus defectuosos en triple hélice central y el destino del ADN vectorial TRIP-GFP seguía al del ADN de virus VIH-1 LA1 de tipo silvestre (figura 3C).

Un defecto de la importación nuclear de ADN era evidente en el caso de vectores HR-GFP y TRIPinv-GFP. El destino intracelular del ADN de estos vectores se caracterizaba por una fuerte acumulación de moléculas lineales no integradas, junto con pequeñas cantidades de provirus integrados y círculos de una y dos LTR. Este perfil de ADN recordaba fuertemente al del virus mutante cPPT-D. Una vez finalizado el tratamiento del ADN de vector en células transducidas, del 70% al 80% del ADN de las construcciones de HR-GFP y TRIPinv-GFP permaneció en forma de moléculas lineales no integradas, mientras que solo del 10 al 15% estaba presente como no integrados en círculos de LTR y del 5 al 10% como provirus integrados. Esta cantidad, baja pero detectable, del ADN vectorial integrado explicaría la transducción génica obtenida usando los vectores HR-GFP y TRIPinv-GFP.

Este ensayo cuantitativo también mostraba que la inserción de la secuencia de triple hélice de ADN de VIH en el vector HR en la orientación correcta complementa su deficiencia de importación nuclear hasta niveles de tipo silvestre. El estado final del ADN de TRIP-GFP en células transducidas era similar al observado con virus del VIH-1 de tipo silvestre: el 50% o más del ADN de vector integraba la cromatina de la célula diana, una fracción importante se circularizaba y unas pocas moléculas permanecían como ADN lineal no integrado (compárense las figuras 5D y 3C). Por el contrario, la inserción de la secuencia de triple hélice en el vector HR cadena arriba del promotor CMV interno no influía sobre la expresión de GFP a nivel transcripcional. Esto se comprobó mediante la transfección de células HeLa con plásmidos pHR-GFP, pTRIPGFP y pTRIPinv-GFP y cuantificación de la fluorescencia (no se muestran los datos).

Puede deducirse a partir de estos resultados que el aumento de la transducción de GFP obtenido con el vector TRIP-GFP puede atribuirse completamente a la fuerte estimulación de su importación nuclear mediante la presencia de la triple hélice. Este descubrimiento hace hincapié de nuevo el papel importante de la triple hélice de ADN de VIH en la importación nuclear de ADN viral y vectorial.

Ejemplo 10: *Los vectores de VIH-1 que contienen la secuencia de triple hélice de ADN permiten una transferencia génica eficaz en células madre hematopoyéticas*

Las figuras 7A y 7B ilustran los resultados de dos experimentos de transducción exitosos usando células de sangre del cordón umbilical humano CD34+. Estos mostraron que después de un protocolo de transducción corto de 24 ó 60 horas, el 71,5% y más del 90%, respectivamente, de las células CD34+ expresan firmemente la proteína informadora GFP. Esta expresión refleja la transducción estable de las células, dado que se confirmaba la integración viral, al menos en las mismas proporciones, mediante ensayos de PCR en ADN extraído a partir de colonias de células derivadas de los progenitores recogidas 14 días después de haber sembrado células en el ensayo de progenitor clonagénico. Se obtuvieron resultados idénticos usando células CD34+ recién purificadas o las mismas células CD34+ que se habían congelado después de la purificación y se descongelaron varias semanas después para el experimento de transducción. También se obtuvieron eficacias de transducción comparables usando otra fuente de células madre hematopoyéticas, células madre movilizadas de sangre periférica (PBMC), recogidas mediante citaféresis después de la estimulación con citoquina. También se transdujeron PBMC CD34+ inmediatamente después de la purificación o después de una etapa de congelación/descongelación con resultados idénticos. Usando un cultivo a largo plazo (LTC) y ensayos de repoblación NOD-SCID se mostraba que se habían transducido células que tenían múltiples potencialidades linfomiélicas y la capacidad de repoblar médula ósea de ratón NOD-SCID 4 meses después del injerto. Estos ensayos funcionales representan el experimento definitivo disponible, en este momento, para evaluar la función de las células madre hematopoyéticas humanas.

Ejemplo 11: *La presencia de la secuencia de triple hélice de ADN en construcciones de vector lentiviral estimula fuertemente la transferencia génica dentro de células madre hematopoyéticas*

Se diseñó el experimento de dosis/respuesta descrito en la figura 8 (representativo de 3 experimentos) para comparar la eficacia de la transducción en células madre hematopoyéticas humanas de vectores de VIH-1 que incluyen o carecen de la secuencia de triple hélice de ADN. En primer lugar, se representó gráficamente (A) el porcentaje de células CD34+eGFP+ obtenidas en función de la concentración del vector usado para la transducción. Se observó que, independientemente de la dosis de vector, el vector TRIP+ fue más eficaz que el TRIP-, con una

media respectivamente del $40 \pm 19\%$ y el $15,4 \pm 12,5\%$ de células CD34+ que son eGFP+ para 500 ng de P24 viral/ml de cada vector (n= 3 exp). Se obtuvo un aumento de 4-6 veces en el porcentaje final de células GFP+ después de la transducción mediante el vector TRIP-GFP en comparación con los resultados obtenidos después de la transducción con el vector HR-GFP. Se resalta también la diferencia en la eficacia entre los dos vectores cuando se representa gráficamente la media de la intensidad de la fluorescencia en función de la dosis de virus. Se alcanza una meseta para el vector TRIP-(HR-GFP) a una dosis de 100 ng de P24/ml mientras que la intensidad de la fluorescencia en células transducidas aumenta con la dosis de vector TRIP+. Esto podría reflejar la limitación en la importación nuclear de las formas pre-integrativas del vector TRIP- y el número creciente de copias integradas por célula después de la transducción con dosis crecientes del vector TRIP-GFP. La tercera representación gráfica integra ambos aspectos y muestra el efecto resultante de la secuencia de triple hélice de ADN sobre la actividad de la fluorescencia de GFP en CMH humanas. Tal como se muestra, la presencia de la secuencia de triple hélice de ADN en el vector VIH induce un aumento de la producción de GFP en CMH con un factor de más de diez veces.

Ejemplo 12: *Una fracción de copias integradas de genomas de vector de VIH permanece en silencio en células transducidas hematopoyéticas humanas*

Es posible que se produzca la inactivación del transgén integrado. La eficacia de la transferencia era siempre mejor cuando se evaluaba mediante el porcentaje de colonias celulares derivadas del progenitor transducidas, determinado mediante ensayo de PCR para el vector lentiviral integrado en lugar de cuando se evaluaba mediante el porcentaje de células CD34+/eGFP+, determinado mediante análisis FACS 48 horas después del final del protocolo de transducción. Esto refleja la aparición de provirus transcripcionalmente inactivos debido a su sitio de integración o a la inactivación aleatoria y progresiva del provirus mientras las células proliferan y se diferencian. Se han observado colonias derivadas de un único progenitor clonagénico mielóide que algunos de los subclones pueden ser brillantes para GFP mientras que otros fueron negativos, reflejando la inactivación transcripcional aleatoria del transgén integrado en esta progenie clonal fenotípicamente homogénea.

Ejemplo 13: *Los vectores de VIH que contienen una versión deletada de la región U3 de la LTR y un EF1 α interno son sistemas más potentes para la transducción de células madre hematopoyéticas*

En la figura 9, se compara la capacidad de diversos vectores derivados del VIH-1, incluyendo la secuencia de triple hélice de ADN, para transducir células CD34+ de sangre del cordón umbilical humano. Se analizó el efecto de la delección de la mayor parte de la región U3 de la LTR en 3' sobre la transducción de GFP y la expresión en células CD34+. Se realizó la comparación de vectores que contienen una LTR de VIH-1 intacta o una versión deletada en U3 en el contexto de un promotor interno de CMV o un promotor interno de EF1 α (Kim *et al.*, 1990) para impulsar la expresión del gen informador de GFP. Se realizaron todos los experimentos de transducción usando la misma concentración de partículas vectoriales (500 ng de P24/ml) después de la normalización de los vectores madre usando un ensayo ELISA disponible en el mercado para el antígeno de VIH-1 (Dupont) P24 (proteína de la cápsida). Se realizaron análisis por citometría de flujo (FACS) a las 48 horas (figura 9A) o a las 120 horas (figuras 9B) después del periodo de transducción de 24 horas.

De forma interesante, la delección de la región U3 de la LTR en vectores VIH-1 inducía un ligero aumento en el porcentaje de células positivas para GFP en todos los casos. Este aumento era modesto cuando se analizaba a las 48 horas. En este momento, un mecanismo de pseudotransducción podía ser responsable de una fracción de las células positivas para GFP. La pseudotransducción es la administración directa de proteínas GFP a células diana mediante la partícula vectorial retroviral de fusión, sin necesidad de una integración real del genoma vectorial retroviral. El aumento en el porcentaje de GFP positiva tras la transducción mediante versiones con U3 deletada de los vectores de VIH-1 se hizo más evidente a las 120 horas después de la transducción (figura 9B). En este momento, se observó un aumento de hasta dos veces en el porcentaje de células positivas para GFP después de la transducción mediante el vector TRIP Δ U3-EF1 α -GFP cuando se compara con los resultados obtenidos con el vector equivalente pero que contiene una LTR de VIH-1 intacta.

De forma más importante, la delección de la región U3 de la LTR del VIH-1 en los vectores de triple hélice del VIH-1 inducía una mejor expresión de la proteína indicadora GFP. La media de la intensidad de la fluorescencia en CMH humanas transducidas cuando se analizaba mediante FACS era siempre superior en un factor de tres a cinco veces en el caso de las versiones con U3 deletada que con vectores que contenían una LTR de VIH-1 intacta. Se observó este beneficio de la expresión de GFP si se usaban los promotores de CMV o de EF1 α como promotor interno en la construcción del vector de VIH-1. No se conoce el mecanismo molecular que explica esta expresión potenciada de proteínas GFP en células transducidas. Alguna secuencia en la LTR de VIH-1 puede influir negativamente en la expresión activada mediante el promotor interno. Como alternativa, una transcripción basal iniciada en la LTR de VIH-1 puede interferir en la iniciación de la transcripción en el promotor interno.

Este estudio también muestra que el promotor de EF1 α es un mejor promotor en CMH humanas que el promotor de CMV. En la figura 9B, la media de la intensidad de la fluorescencia de GFP es de tres a cinco veces mejor en el caso del promotor de EF1 α que en el caso del promotor de CMV.

Referencias

- Barbosa, P., Charneau, P., Durney, N., y Clavel, F. (1994). Kinetic analysis of HIV-1 early replicative steps in a coculture system. *AIDS Research & Human Retroviruses* 10, 53-59.
- 5 Bonnerot, C., Rocancourt, D., Briand, P., Grimber, G., y Nicolas, j. (1987). A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for development studies. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 84, 6795-9.
- Borrito-Esoda, K., y Boone, L. (1991). Equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus DNA synthesis in vitro: characterization of the endogenous reverse transcriptase reaction. *Journal of Virology* 65, 1952-1959.
- 10 Bowerman, B., Brown, P., Bishop, J., y Varmus, H. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes and Development* 3, 469-78.
- 15 Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A., y Stevenson, M. (1998). Establishment of a functional virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *Journal of Experimental Medicine* 188, 2113-25.
- 20 Bukrinsky, M. L., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S., y Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci* 89, 6580-6584.
- Bukrinsky, M., Sharova, N., McDonald, T., Pushkarskaya, T., Tarpley, W., y Stevenson, M. (1993a). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 90, 6125-9.
- 25 Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. y Stevenson M (1993b). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-669.
- 30 Case SS. Price MA. Jordan CT. Yu XJ. Wang L. Bauer G. Haas DL. Xu D. Stripecke R. Naldini L. Kohn DB. Crooks GM. Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(6): 2988-93, 1999.
- 35 Charneau, P., y Clavel, F. (1991). A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *Journal of Virology* 65, 2415-2421.
- Charneau, P., Alizon, M., y Clavel, F. (1992). A second origin of plus strand synthesis is required for optimal HIV replication. *Journal of Virology* 66, 2814-2820.
- 40 Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H., y Clavel, F. (1994). HIV-1 reverse transcription: a termination step at the center of the genome. *Journal of Molecular Biology* 241, 651-662.
- 45 Croisille, L. et al. (1994). Hydrocortisone differentially affects the ability of murine stromal cells and human marrow-derived adherent cells to promote the differentiation of Cd34+/CD38-long-term cultureinitiating cells. *Blood* 84: 4116-4124.
- Dworetzky, S., Lanford, R., y Feldherr, C. (1988). The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *Journal of Cell Biology* 107, 1279-87.
- 50 Emerman, M., Bukrinski, M., y Stevenson, M. (1994). HIV-1 infection of non-dividing cells, reply to Freed EO and Martin MA. *Nature* 369, 108.
- 55 Evans et al., (10 de junio de 1999). *Hum Gene Therapy* 10(9): 1479-89.
- Farnet, C., y Haseltine, W. (1990). Integration of virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 87, 4164-8.
- 60 Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H. Fischer, U., y Malim, M. H. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO Journal* 16, 4531-4539.
- Freed, E. O., y Martin, M. A. (1994). HIV-1 infection of non-dividing cells. *Nature* 369, 107-108.
- 65 Freed, E. O., Englund, G., y Martin, M. A. (1995). Role of the basic domain of virus de la inmunodeficiencia humana

- de tipo 1 matrix in macrophage infection. *Journal of Virology* 69, 3949-3954.
- Freed, E. O., Englund, G., Maldarelli, F., y Martin, M. A. (1997). Phosphorylation of residue 131 of HIV-1 matrix is not required for macrophage infection. *Cell* 88, 171-173.
- 5 Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C., y Trono, D. (1995a). HIV-1 infection of non dividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein as a key regulator. *Cell* 80, 379-388.
- 10 Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., y Trono, D. (1995b) HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83, 569-576.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., y Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 94, 9825-9830.
- 15 Gartner, S., Markovits, P., Marcovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C., y Popovic, M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233, 215-219.
- Gelderblom, H. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5, 617-37.
- 20 Gulizia, J., Dempsey, M., Sharova, N., Bukrinsky, M., Spitz, L., Goldfarb, D., y Stevenson, M. (1994). Reduced nuclear import of virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 preintegration complexes in the presence of a prototypic nuclear targeting signal. *Journal of Virology* 68, 2021-5.
- 25 Hagstrom, J., Ludtke, J., Bassik, M., Sebestyen, M., Adam, S., y Wolff, J. (1997). Nuclear import of DNA in digitonin-penneabilized cells. *Journal of Cell Science* 110, 2323-31.
- Hamm, J., y Mattaj, J. (1990). Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* 63, 109-18.
- 30 Harada, S., Koyanagi, Y., y Yamamoto, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-1-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229, 563-6.
- Harris, J. D., Scott, J. V., Traynor, B., Brahic, M., Stowring, L., Ventura, P., Haase, A. T., y Peluso, R. (1981). Visna virus DNA: discovery of a novel gapped structure. *Virology*, 573-583.
- 35 Heinzinger, N., Bukinsky, M., Haggerty, S., Ragland, A., Kewalramani, V., Lee, M., Gendelman, H., Ratner, L., Stevenson, M., y Emerman, M. (1994). The Vpr protein of virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 91, 7311-5.
- 40 Ho, D., Rota, T., y Hirsch, M. (1986). Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *Journal of Clinical Investigation* 77, 1712-1715.
- 45 Huber, H. E., y Richardson, C. C. (1990). Processing of the primer for plus strand DNA synthesis by human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 10565-10573.
- Hungnes, O., Tjotta, E., y Grinde, B. (1992) Mutations in the central polypurine tract of HIV-1 result in delayed replication. *Virology* 190, 440-2.
- 50 Issaad, C. et al. (1993). A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34+/+ CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* Vol. 81, No 11: págs. 2916-2924.
- Kalderon, D., Roberts, B., Richardson, W., y Smith, A. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
- 55 Karageorgos, L., Li, P., y Burrell, C. (1993). Characterisation of HIV replication complexes early after cell to cell infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 817-823.
- 60 Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 1990, 91: 217-223.
- Klarmann, G., Schaubert, C., y Preston, B. (1993). Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 9793-802.
- 65 Koostra, N., y Schuitemaker, H. (1999). Phenotype of HIV-1 lacking a functional nuclear localization signal in matrix protein of gag and Vpr is comparable to wild-type HIV-1 in primary macrophages. *Virology* 253, 170-80.

- Kunkel, T. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 82, 488-92.
- 5 Lanford, R., y Butel, J. (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37, 801-13.
- Lavigne, M., Roux, P., Buc, H., y Schaeffer, F. (1997). DNA curvature controls termination of plus strand DNA synthesis at the centre of HIV-1 genome. *Journal of Molecular Biology* 266, 507-524.
- 10 Lewis, P., Hensel, M., y Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO Journal* 11, 3053-3058.
- Lori, F., di Marzo Veronese, F., de Vico, A., Lusso, P., Reitz, M. J., y Gallo, R. (1992). Viral DNA carried by virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 virions. *J. Virol.* 66, 5067-5074.
- 15 Miller, M., Farnet, C., y Hushman, F. (1997). Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of Virology* 71, 5382-90.
- Miyoshi H. Smith KA. Mosier DE. Verma IM. Torbett BE. (29 de enero de 1999). Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283(5402): 682-6.
- 20 Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F., Verma, I., y Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by un vector lentiviral. *Science* 272, 263-7.
- 25 Panet, A., Baltimore, D., y Hanafusa, H. (1975). Quantitation of avian RNA tumor virus reverse transcriptase by radioimmunoassay. *J. Virol.* 16, 146-152.
- Pflumio, F. et al. (1996). Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 88: 3731-3740.
- 30 Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M. A., Ratner, L., Lane, C. M., Moore, M. S., Blobel, G., y Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO Journal* 17, 909-917.
- 35 Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., y Sodroski, J. (1991). Gene transfer into human lymphocytes by a defective virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I vector. *Journal of Virology* 65, 532-6.
- Robin, C. et al. (1999). Identification of T-lymphoid progenitor cells in CD34+CD38^{low} and CD34+CD38⁺ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *Br J Haematol* 104: 809-819.
- 40 Roe, T. Y., Reynolds, T. C., Yu, G., y Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 12, 2099-2108.
- 45 Stetor, S., Rausch, J., Guo, M., Burnham, J., Boone, L., Waring, M., y Le Grice, S. (1999). Characterization of (+) strand initiation and termination sequences located at the center of the equine infectious anemia virus genome. *Biochemistry* 38, 3656-67.
- Thormar, H. (1963). The growth cycle of Visna virus in monolayer cultures of sheep cells. *Virology* 19, 273-278.
- 50 Uchida *et al.* (Sep 29, 1998). *PNAS Estados Unidos* 95(20): 11939-44.
- von Schwedler, U., Kombluth, R., y Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 91, 6992-6.
- 55 Weinberg, J. B., Matthews, T.J., Cullen, B. R., y Malim, M. H. (1991). Productive virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 174, 1477-1482.
- 60 Whittaker, G., y Helenius, A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246, 1-23.
- Yee, J., Miyanochara, A., LaPorte, P., Bouic, K. Burns, J., y Friedmann, T. (1994). A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. of Sci. Estados Unidos* 91, 9564-8.
- 65

LISTA DE SECUENCIAS
 <110> INSTITUT PASTEUR
 INSERM

- 5 <120> ADN DE TRIPLE HÉLICE LENTIVIRAL, Y VECTORES Y CÉLULAS RECOMBINANTES QUE CONTIENEN
 ADN DE TRIPLE HÉLICE LENTIVIRAL
 <130> B4681AC – AD/LV/KN
- 10 <140> 07000486.6
 <141> 10-01-2007
 <150> 60/158.387
 <151> 12-10-1999
- 15 <150> PCT/EP00/10418
 <151> 10-10-2000
 <160> 24
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1.
 <210> 1
 <211> 25
- 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR DE MUTAGÉNESES
 BASADO EN EL PLÁSMIDO pLAI3
- 30 <400> 1
 caattttaa agaagagggg ggatt 25
- 35 <210> 2
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR DE MUTÁGENESIS
 BASADO EN EL PLÁSMIDO pLAI3
 <400> 2
- 45 attcatccac aactcaagc gccgcggtgg tattgggggg tac 43
 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
 AMPLIFICAR ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA LA PROTEÍNA VERDE
 FLUORESCENTE POTENCIADA
- 55 <400> 3
 ccggatccc accggtcgcc acc 23
- 60 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 65 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA

AMPLIFICAR NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LA PROTEÍNA VERDE
FLUORESCENTE POTENCIADA

- 5 <400> 4
ccctcgagct agagtcgcg ccg 23
- <210> 5
<211> 47
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
AMPLIFICAR pUCLTRRI-.
- 15 <400> 5
cggaattcgg atccgcgcc gcatcgatct tgtctcgtt gggagtg 47
- <210> 6
20 <211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
AMPLIFICAR pUCLTRRI-.
- <400> 6
30 cggaattcag ccgtctcgag agatgctgca tataagcagc 40
- <210> 7
<211> 38
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
AMPLIFICAR cPPT Y CTS DE pLAI3
- 40 <400> 7
gtggtcggcg ccgaattcac aaatggcagt attcatcc 38
- <210> 8
45 <211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
50 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
AMPLIFICAR cPPT Y CTS DE pLAI3
- <400> 8
gtcgtcggcg ccccaaagtg gatctctgct gtcc 34
- 55 <210> 9
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉLICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN
LA MATRIZ pLai
- 65 <400> 9
gtcgtcggcg ccgaattcac aaatggcagt attcatcc 38

ES 2 377 721 T3

<210> 10
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
 AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉLICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN
 LA MATRIZ pLai
 10
 <400> 10
 agcctcacga cgcgtatcag ccaaagtgga tctctgctg 39
 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial; CEBADOR PARA
 AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉLICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN
 LA MATRIZ pEFpgkneo
 20
 <400> 11
 ctgatacgcg tcgtgaggct ccggtg 26
 <210> 12
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
 AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉLICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN
 LA MATRIZ pEFpgkneo
 35
 <400> 12
 cgggatcctg tgttctggcg gcaaac 26
 <210> 13
 <211> 23
 <212>
 ADN <213> Horno sapiens
 40
 <400> 13
 ccctcgagct agagtcgcg ccg 23
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Horno sapiens
 45
 <400> 14
 ccgatcccc accggtcgcc acc 23
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
 LA AMPLIFICACIÓN DE ADN VIRAL DE pLAI3
 55
 <400> 15
 agaagaaatg atgacagcat g 21

<210> 16
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
 LA AMPLIFICACIÓN DE ADN VIRAL DE pLAI3
 10 <400> 16
 tgccagtct agctctg 17
 <210> 17
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
 LA SÍNTESIS DE LA SONDA PARA EL VECTOR pTRIPGFP
 20 <400> 17
 cagggacttg aaagcгааag 20
 25 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA
 LA SÍNTESIS DE LA SONDA PARA EL VECTOR pTRIPGFP
 35 <400> 18
 gcttgtgtaa ttqtaatt ctctgtc 27
 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)
 45 <223> Secuencia parcial de cPPT de VIH-1.
 <400> 19
Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly
 1 5
 50 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 55 <400> 20
 ttttaaаaga aaagggggg 19
 <210> 21
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: MUTACIÓN
 65 INTRODUCIDA EN LA SECUENCIA DE cPPT DE VIH-1

ES 2 377 721 T3

<400> 21
ttttaaacgc aaagtggt 19

5 <210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: PÉPTIDO MUTANTE DE LA SECUENCIA DE cPPT DE VIH-1

<400> 22
Asn Phe Lys Arg Arg Gly Gly
1 5

15 <210> 23
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: MUTACIÓN
INTRODUCIDA EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DE cPPT DE VIH-1

25 <400> 23
ttttaaaga agagggggg 19

30 <210> 24
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: MUTACIONES
INTRODUCIDAS EN LA SECUENCIA CODIFICANTE DE cPPT DE VIH-1

<400> 24
ctcaagcgc cgcggtgt 19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un vector retroviral, que comprende regiones cPPT y CTS de origen lentiviral en el que la LTR se deleciona para el promotor y potenciador de U3, para aumentar *in vitro* la tasa de importación, de una secuencia de ácido nucleico contenida en dicho vector, en el núcleo de una célula huésped.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho vector retroviral es un vector lentiviral.
- 10 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho vector lentiviral es un vector derivado de VIH.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho vector retroviral es un vector de expresión o un vector de integración.
- 15 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho vector retroviral es un vector de sustitución en el que todas las secuencias codificantes retrovirales entre las LTR están delecionadas.
6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ácido nucleico heteróloga.
- 20 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un péptido, polipéptido o proteína.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica una proteína terapéutica.
- 25 9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha célula es una célula eucariota.
10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha célula es una célula que se divide o una célula que no se divide.
- 30 11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el que dicha célula es una célula de mamífero, siempre que dicha célula no sea una célula germinal humana.
- 35 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha célula es una célula hematopoyética, tal como una célula madre hematopoyética.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el que dicha célula es un derivado de una célula como se define en la reivindicación 11 ó 12.
- 40 14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dichas regiones cPPT y CTS se originan a partir de VIH, tal como virus VIH-1 o VIH-2, VISNA, VAIE, VIF o AEC.
- 45 15. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el porcentaje de células expuestas al ácido nucleico contenido en el vector retroviral que captan dicho vector en su núcleo es superior al 30%, preferiblemente superior al 50% y más preferiblemente superior al 80%.
- 50 16. Un vector retroviral, que comprende regiones cPPT y CTS de origen lentiviral y una LTR de origen retroviral con el promotor y potenciador de su región U3 delecionados, para su uso para aumentar la tasa de importación de un ácido nucleico contenido en dicho vector, en el núcleo de una célula huésped, para tratar a dicho huésped.
17. Un vector retroviral de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho vector retroviral es un vector lentiviral.
- 55 18. Un vector lentiviral de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho vector lentiviral es un vector derivado de VIH.
19. Un vector retroviral o lentiviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, que es un vector de expresión o un vector de integración.
- 60 20. Un vector retroviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, que es un vector de sustitución en el que todas las secuencias codificantes retrovirales entre las LTR están delecionadas.
21. Un vector retroviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que dicha secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ácido nucleico heteróloga.
- 65 22. Un vector retroviral de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica un péptido, polipéptido o proteína.

23. Un vector retroviral de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica una proteína terapéutica.
- 5 24. Un vector retroviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicha célula es una célula eucariota.
25. Un vector retroviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que dicha célula es una célula que se divide o una célula que no se divide.
- 10 26. Un vector retroviral de acuerdo con la reivindicación 24 ó 25, en el que dicha célula es una célula de mamífero, siempre que dicha célula no sea una célula germinal humana.
- 15 27. Un vector retroviral de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dicha célula es una célula hematopoyética, tal como una célula madre hematopoyética.
28. Un vector retroviral de acuerdo con la reivindicación 24 ó 25, en el que dicha célula es un derivado de una célula como se define en la reivindicación 26 ó 27.
- 20 29. Un vector retroviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 28, en el que dichas regiones cPPT y CTS se originan a partir de VIH, tales como virus VIH-1 o VIH-2, VISNA, VAIE, VIF o AEC.
- 25 30. Un vector retroviral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 29, en el que el porcentaje de células expuestas al ácido nucleico contenido en el vector que captan dicho vector en su núcleo es superior al 30%, preferiblemente superior al 50% y más preferiblemente superior al 80%.

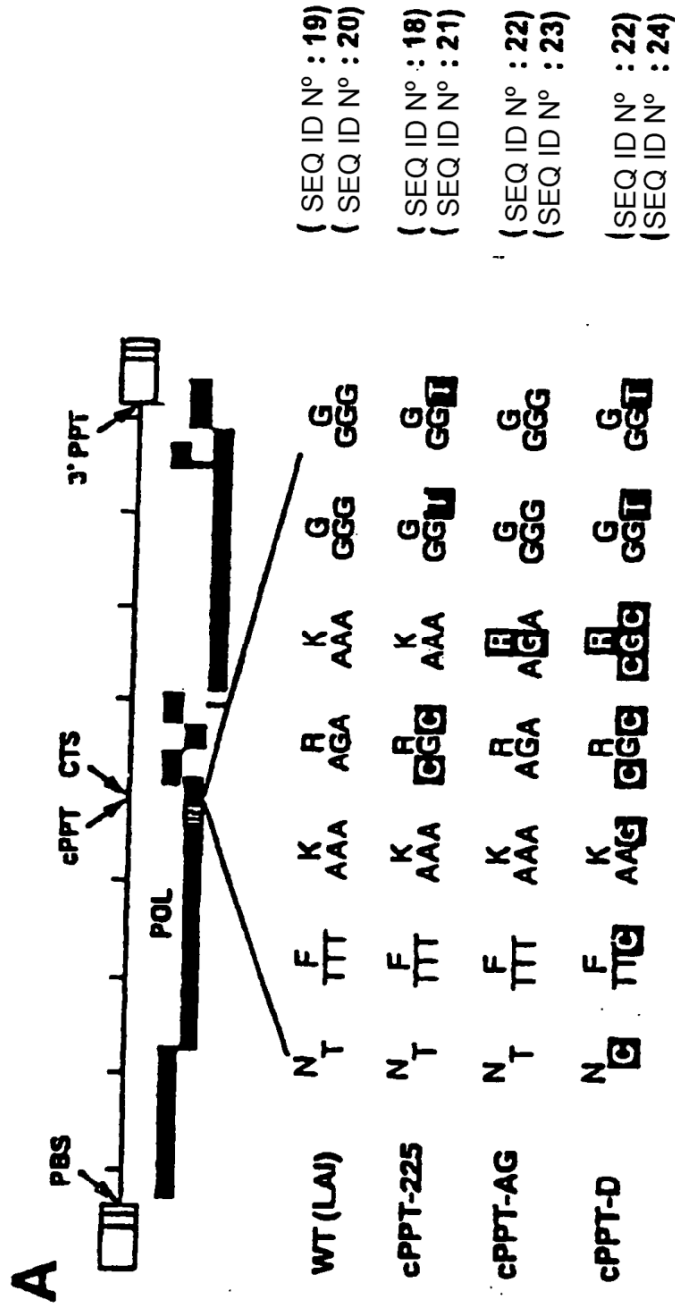


FIG. 1A

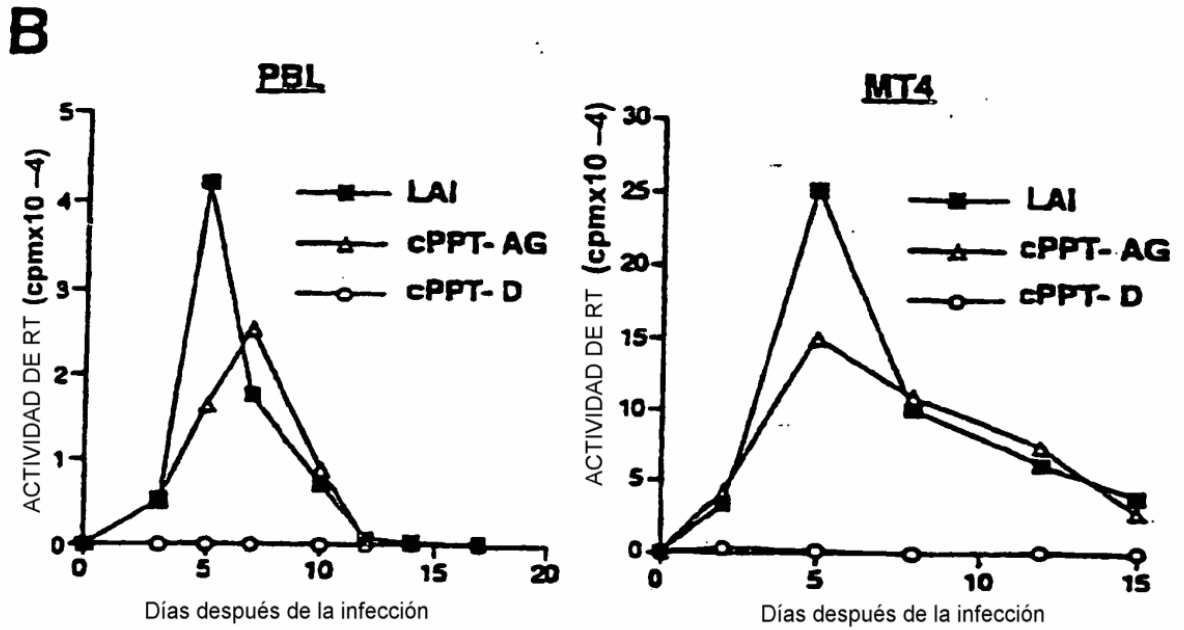


FIG. 1B

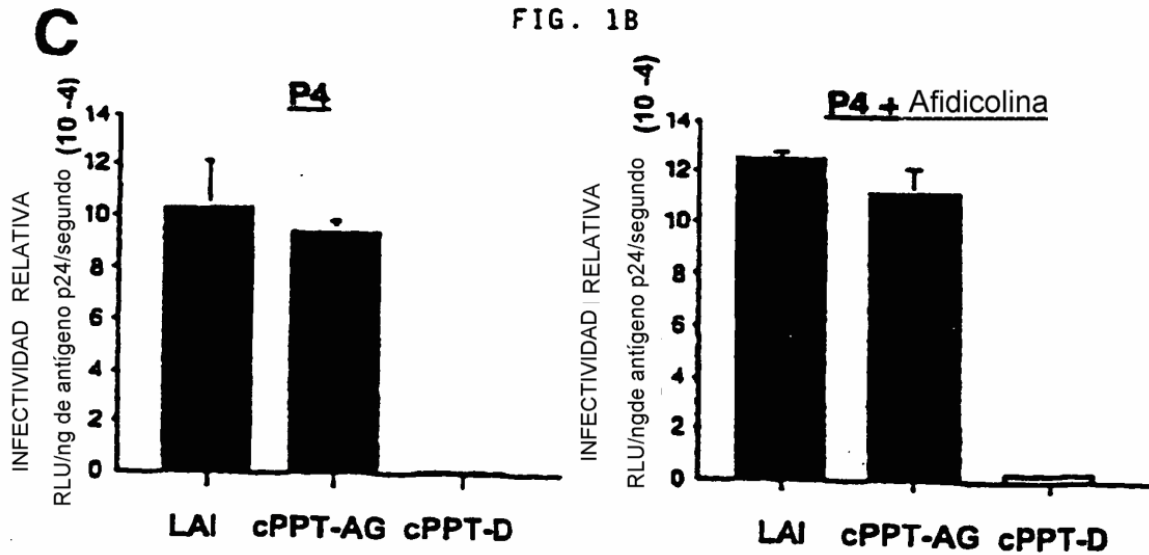


FIG. 1C

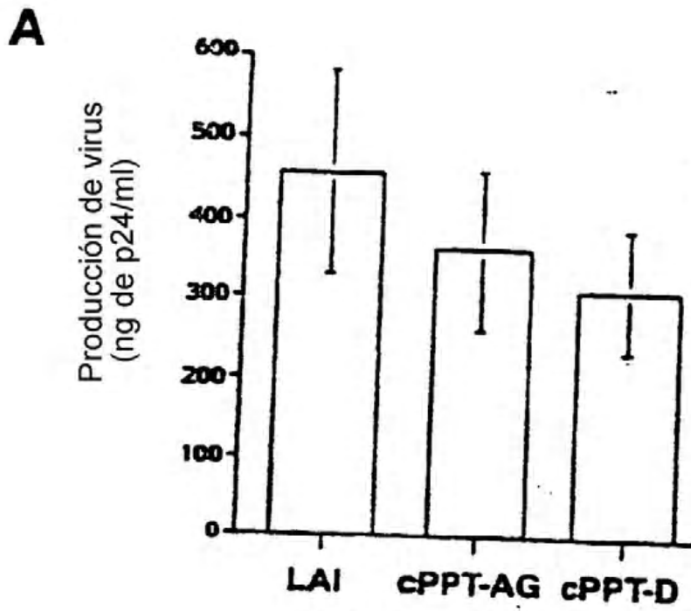


FIG. 2A

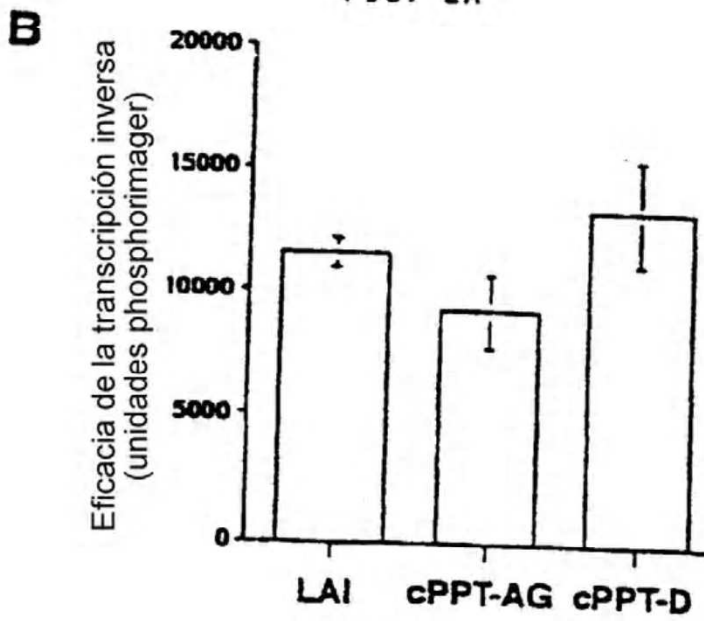


FIG. 2B

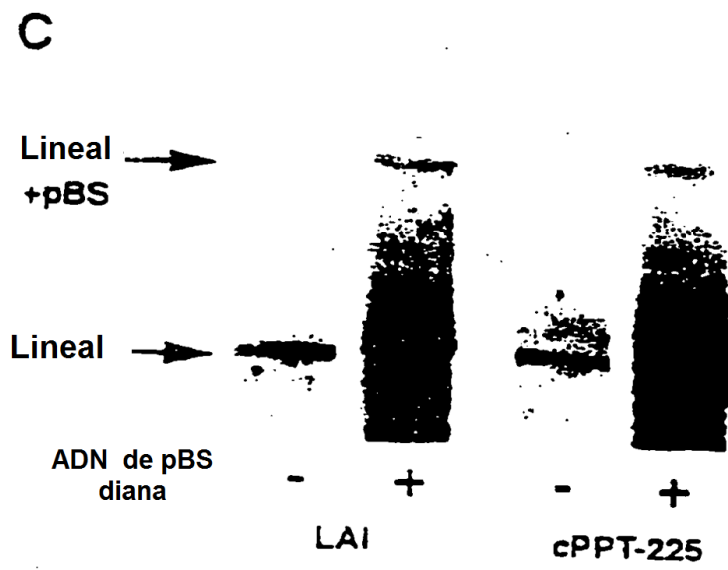
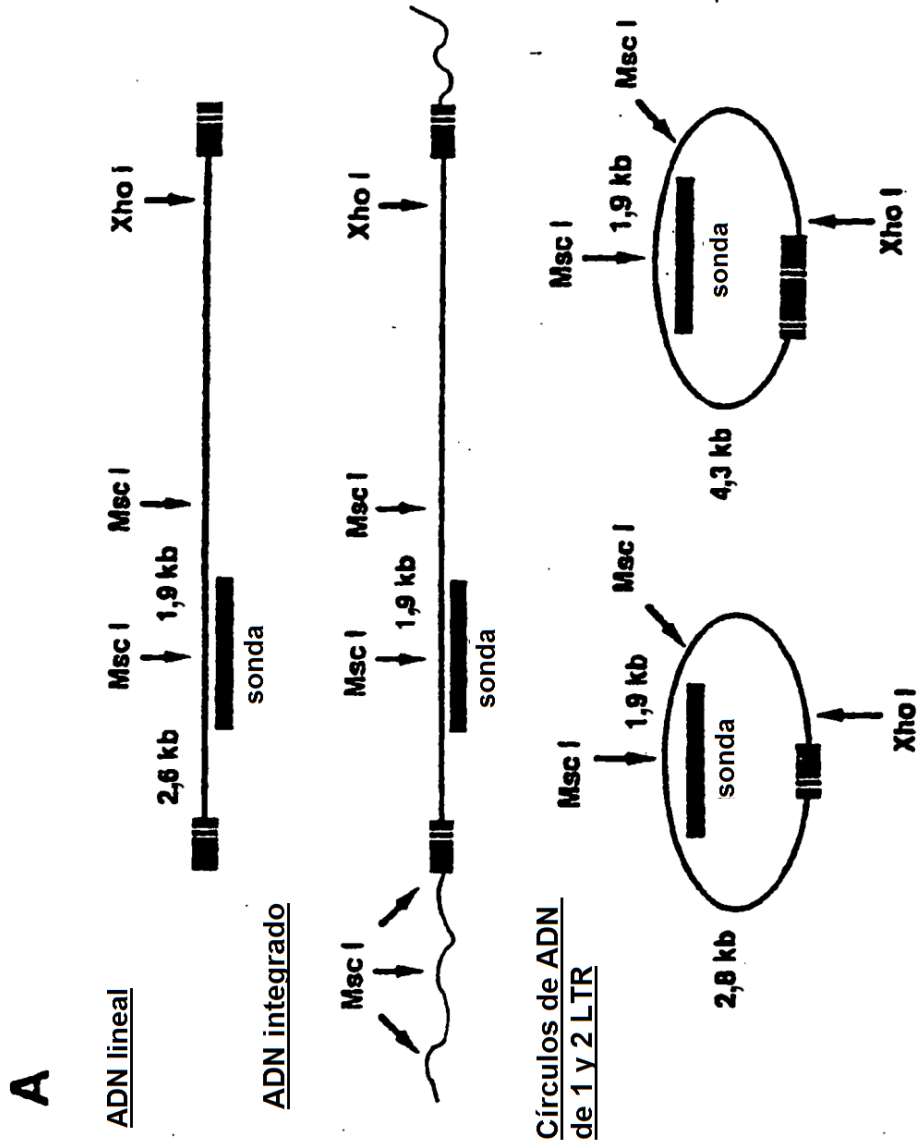


FIG. 2C

FIG. 3A



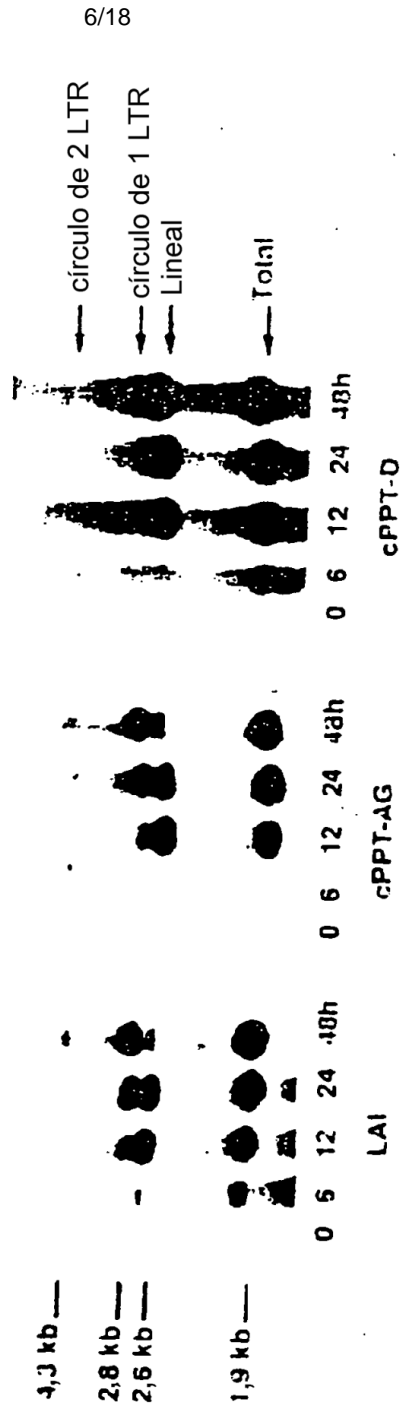
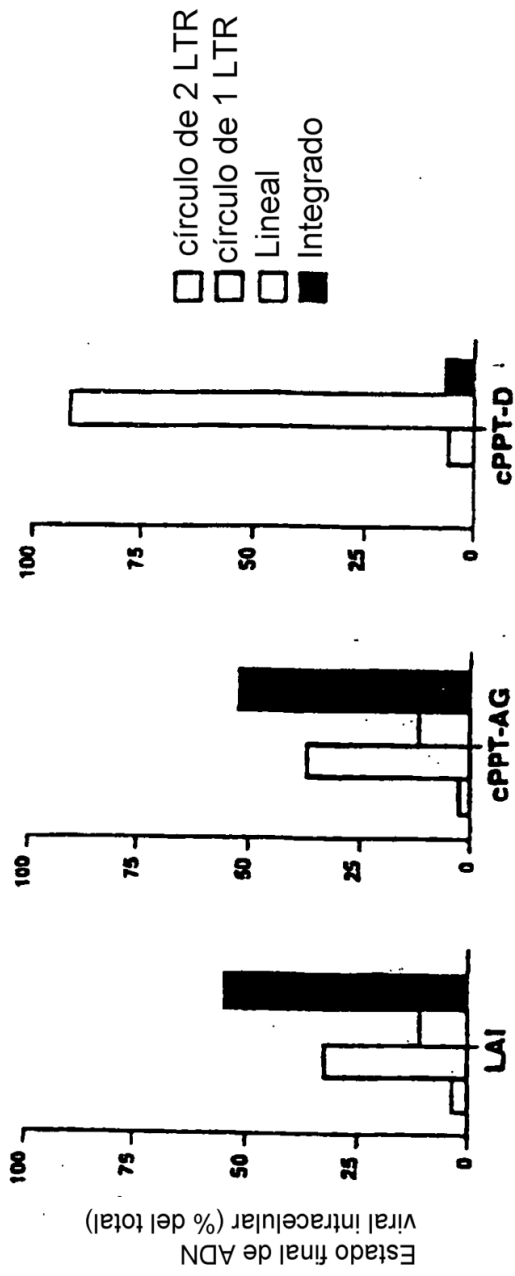


FIG. 3B

FIG. 3C



C

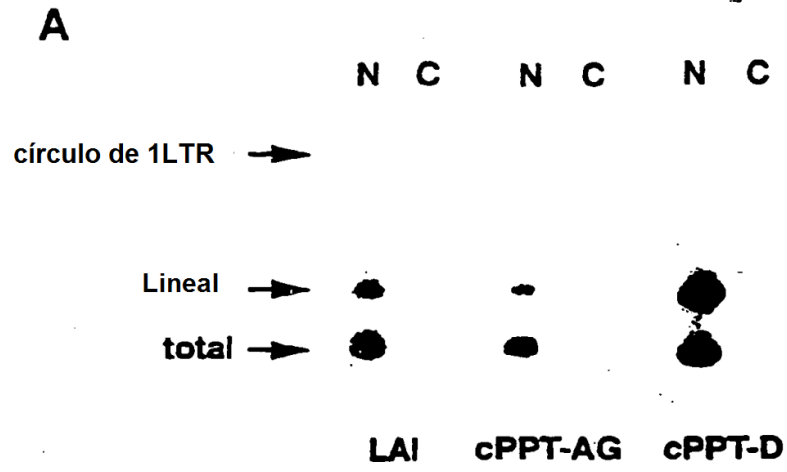


FIG. 4A

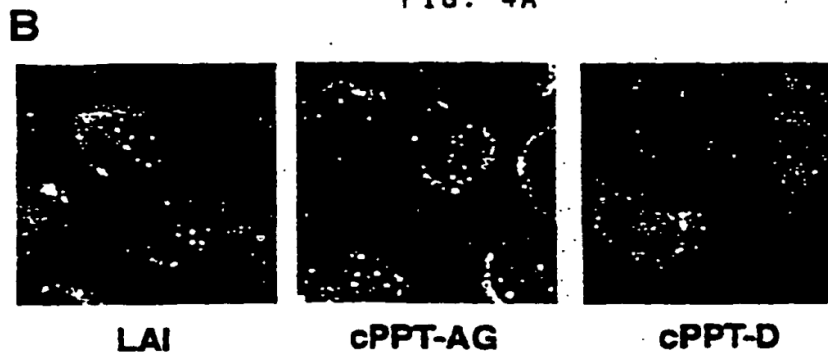


FIG. 4B

9/18

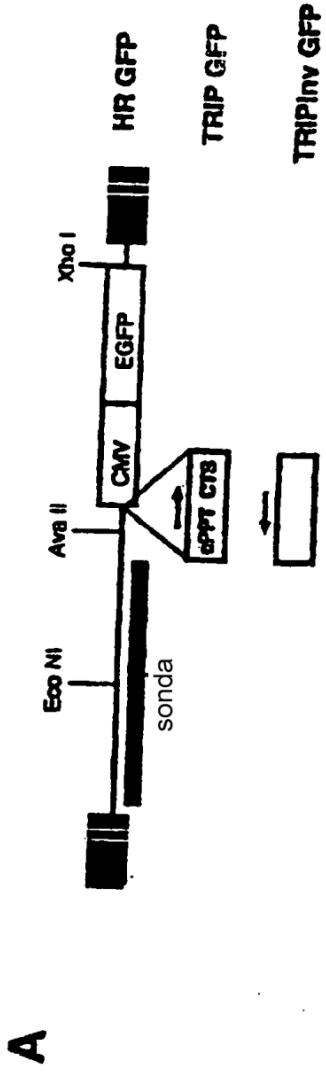


FIG. 5A

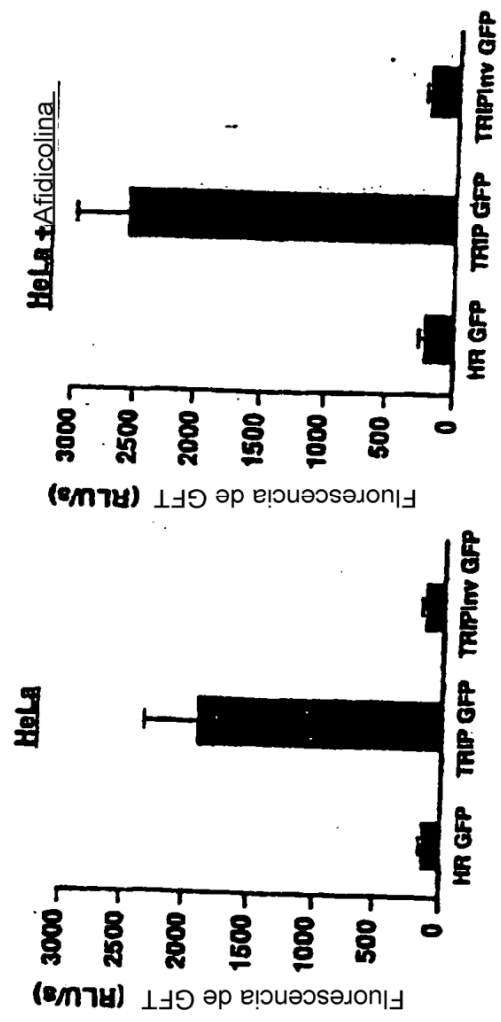


FIG. 5B

FIG. 5C

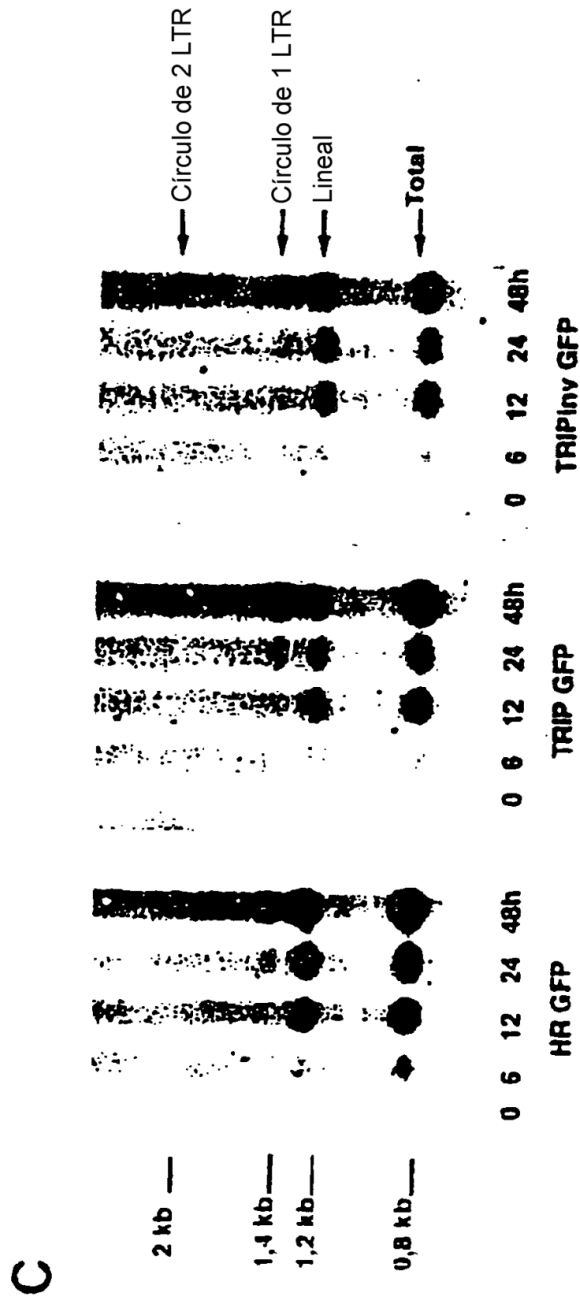
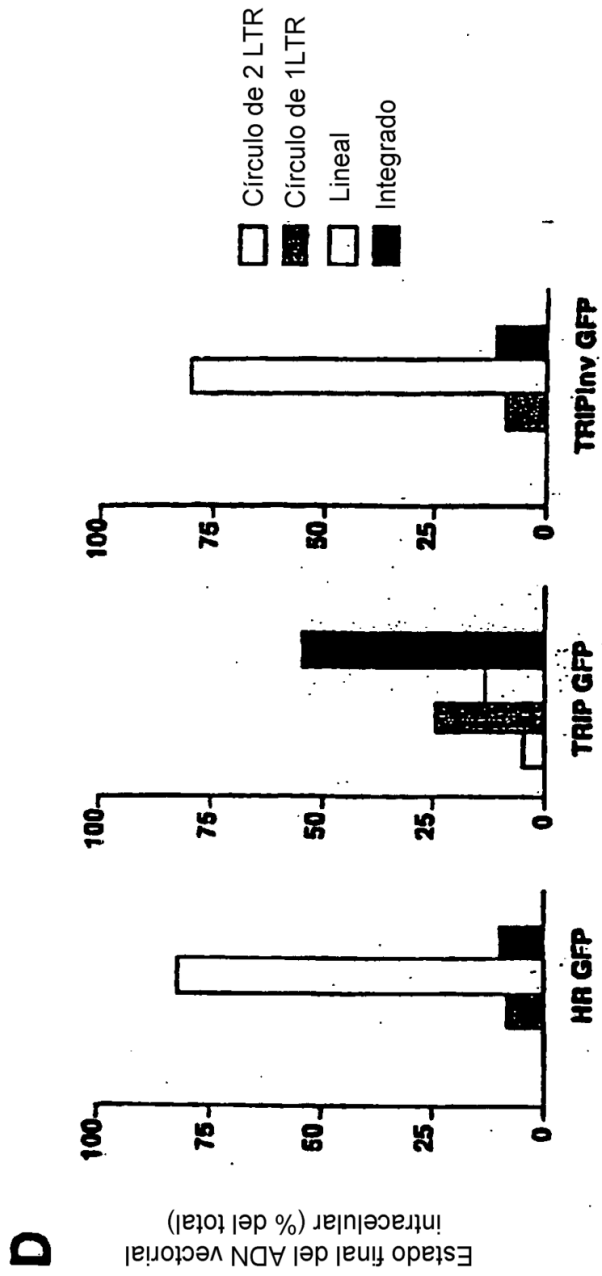
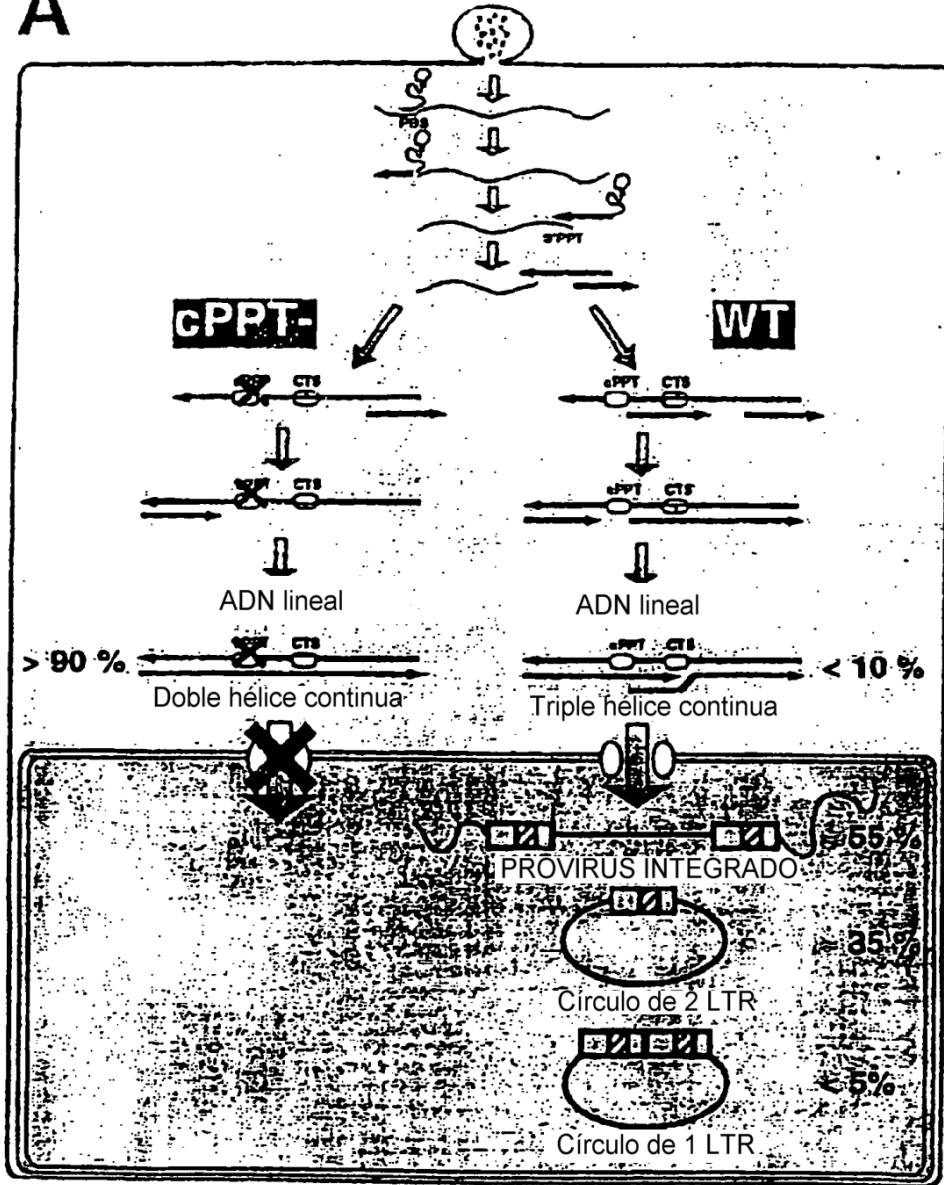


FIG. 5D



A



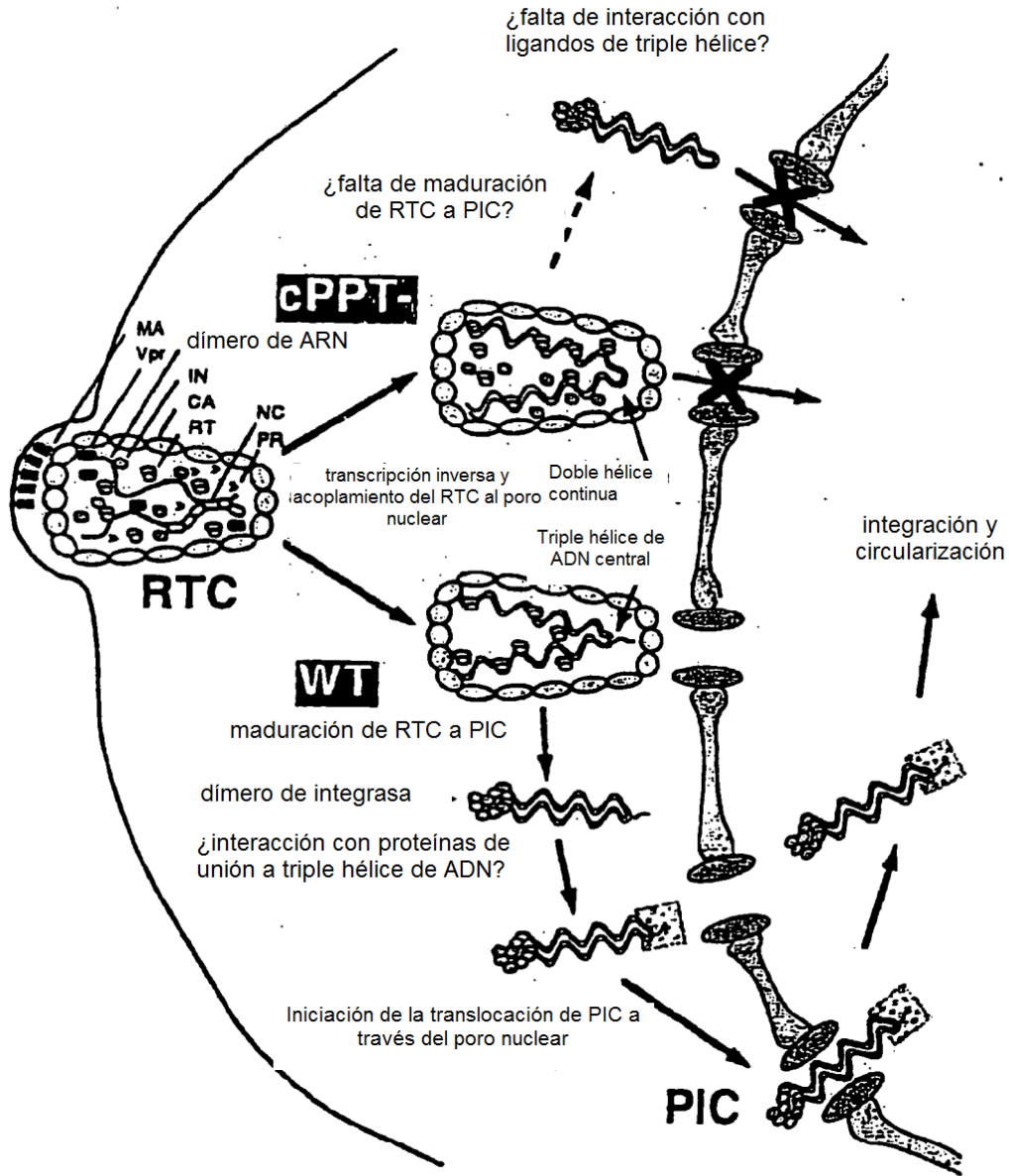


FIG. 6B

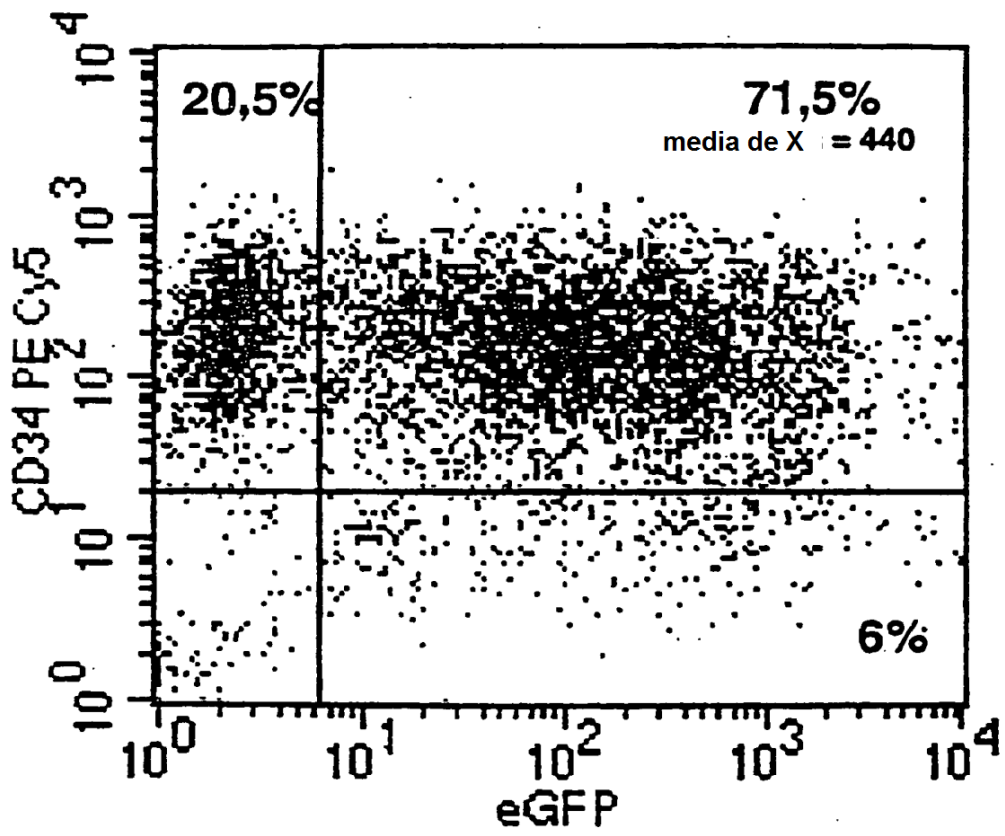


FIG. 7A

F1A

TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS MADRE CDD34+ MEDIANTE VECTORES DE TRIPLE HÉLICE DE VIH

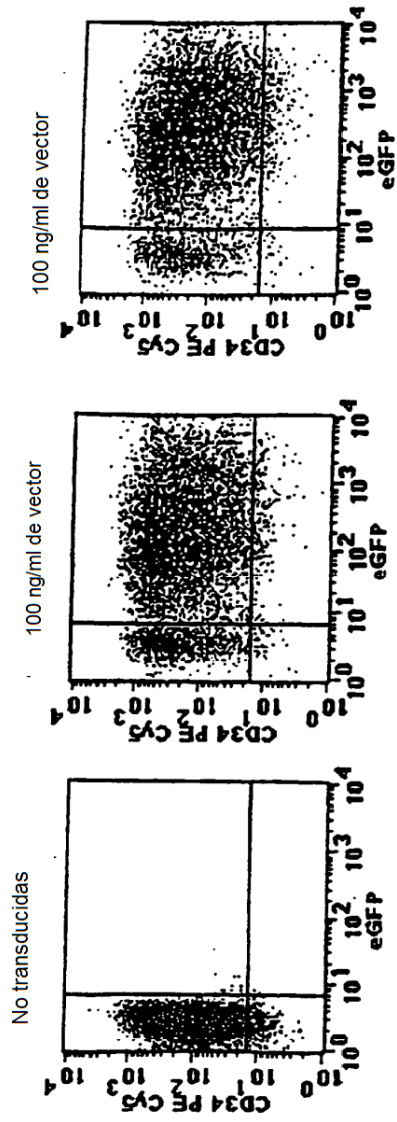


FIG. 7B

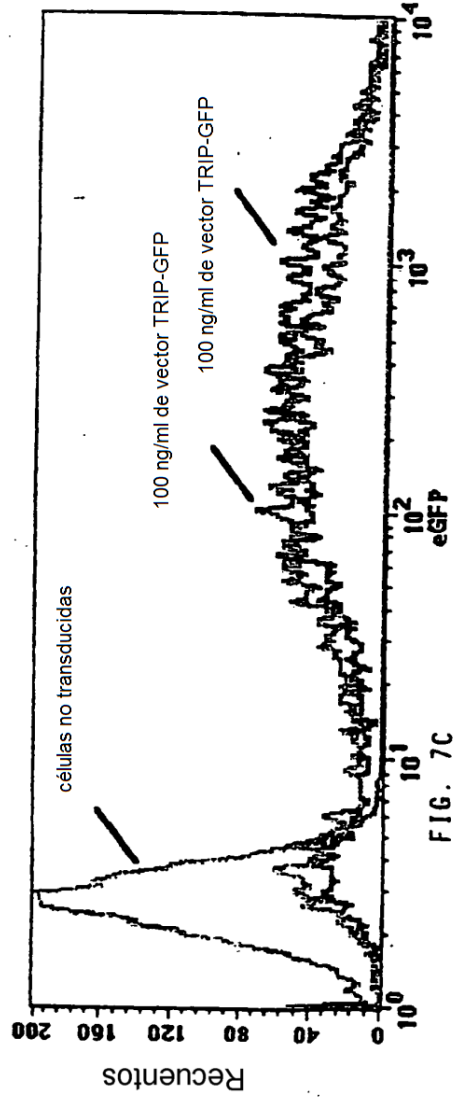
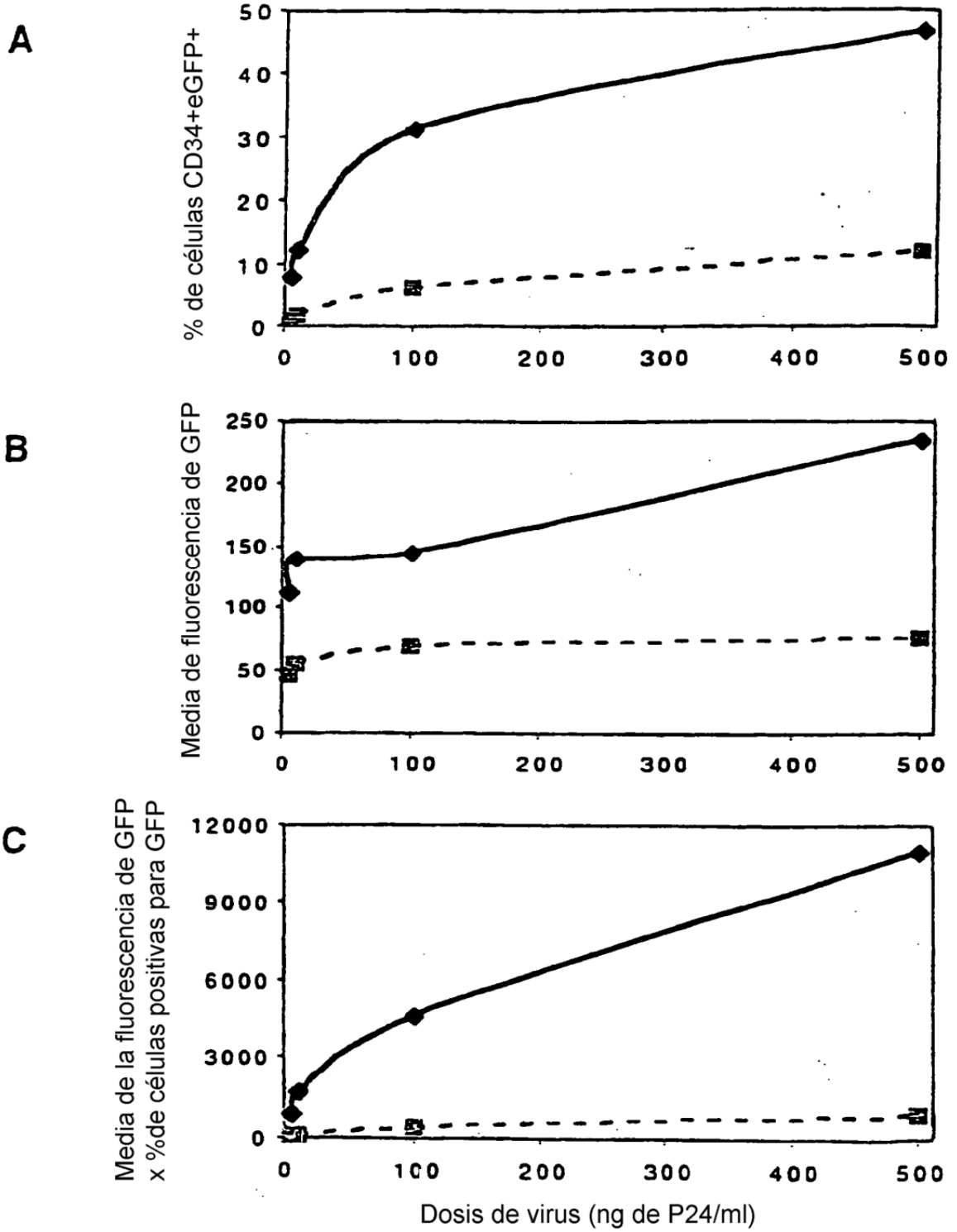


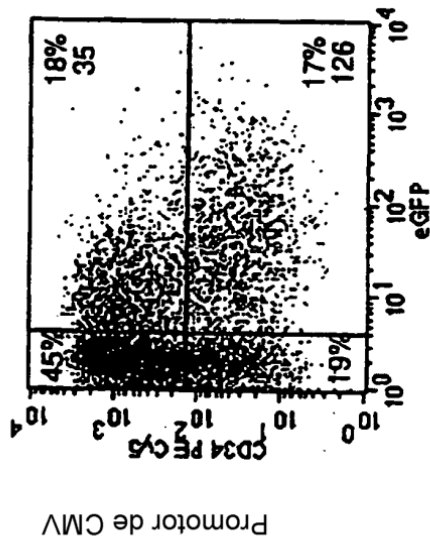
FIG. 7C

16/18

FIG. 8



LTR de VIH-1



Promotor de CMV

LTR DE VIH-1 con U3 delecionada

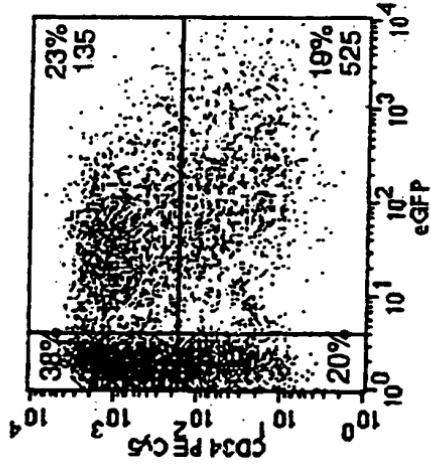
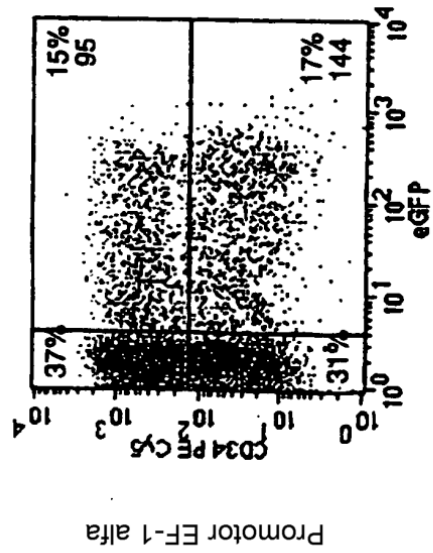


FIG. 9A(1)



Promotor EF-1 alfa

FIG. 9A(2)

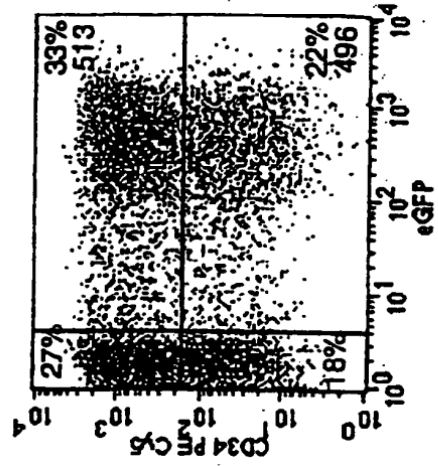


FIG. 9A(3)

FIG. 9A(4)

LTR de VIH-1 con U3 deletcionada

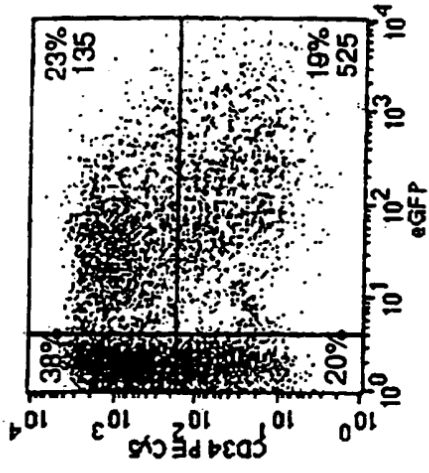


FIG. 9B(2)

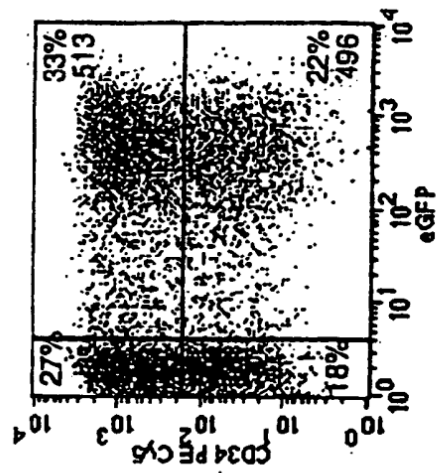


FIG. 9R(4)

LTR de VIH-1

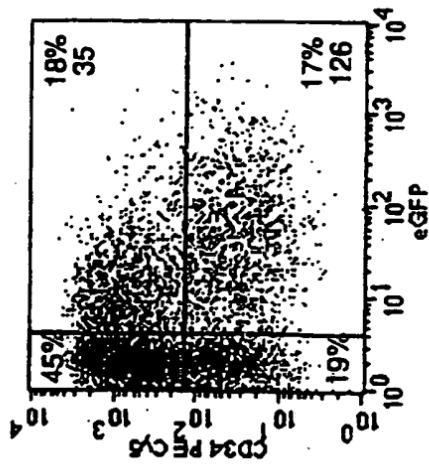


FIG. 9B(1)

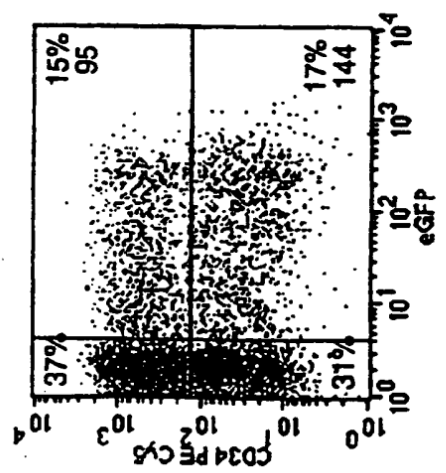


FIG. 9B(3)

Promotor de CMV

Promotor EF-1 alfa