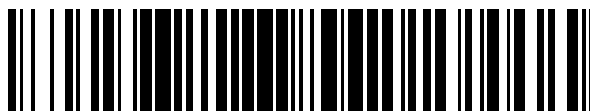


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 829**

51 Int. Cl.:
C07K 14/16 (2006.01)
C12N 15/48 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06765488 .9**
96 Fecha de presentación: **07.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1883649**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.02.2008**

54 Título: **Mutantes de Vif del HIV**

30 Prioridad:
08.03.2005 GB 0504770
26.05.2005 GB 0510888

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.04.2012

73 Titular/es:
MOLMED SPA
VIA OLGETTINA 58
20132 MILAN, IT

72 Inventor/es:
BOVOLENTA, Chiara

74 Agente/Representante:
Campello Estebaranz, Reyes

ES 2 377 829 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutantes de Vif del HIV.

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un vector lentiviral y su uso en un método de impartir resistividad a la infección por HIV, con inclusión de superinfección de HIV.

Antecedentes de la Invención

10 El SIDA es una de las causas principales de muerte en el mundo en desarrollo, alcanzando su propagación proporciones de pandemia. Sin embargo, la erradicación de HIV-1 está lejos de alcanzarse. En la actualidad, la terapia con anti-retrovirales altamente activos (HAART) es el único tratamiento eficaz para reducir la progresión y propagación del SIDA, aunque su uso a largo plazo está asociado con inconvenientes y limitaciones tales como adherencia a un régimen de dosificación complejo, toxicidad con efectos secundarios y coste elevado (Richman et al., 2001). La gran variabilidad genética y antigénica intra- e inter-subtipos del HIV-1, resultante de la alta tasa de mutación de su genoma, junto con cumplimiento inadecuado, es responsable de la resistencia a los fármacos HAART, así como del fracaso repetido en el desarrollo de una vacuna preventiva basada en clados múltiples (Ho et al., 2002). Sobre esta base, es imprescindible el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas y/o adicionales contra el SIDA.

20 Muchos años de investigación pre-clínica han demostrado que el ciclo vital del HIV-1 puede verse interferido a muchos niveles, y han demostrado al menos el concepto de la terapia génica anti-HIV (Buchschacher et al., 2001). Las células madre hematopoyéticas (HSCs), los precursores de células T o los linfocitos T pueden modificarse genéticamente con, por ejemplo, genes codificantes de ribozimas, cebos, moléculas de RNA de interferencia antisentido y pequeño (siRNA) dirigidas contra genes virales y celulares (Buchschacher et al., 2001; Jacque et al., 2002; Novina et al., 2002; Lee et al., 2002; Coburn et al., 2002; Qin et al., 2003), o proteínas tales como intraquinas, toxinas y anticuerpos monocatenarios. Sin embargo, las pruebas clínicas tempranas con linfocitos T transducidos con vectores retrovirales que expresan mutantes transdominantes de proteínas virales o ribozimas anti-HIV-1 han sido decepcionantes (Woffendin et al., 1996; Ranga et al., 1998; Wong-Staal et al., 1998) debido principalmente a la baja eficiencia de transferencia de genes, injerto insuficiente y corta persistencia in vivo de las células T modificadas genéticamente. La mayor parte de los estudios preclínicos y clínicos realizados hasta ahora se han basado en el uso de vectores retrovirales derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MLV) para transducir células HSCs o células T. Sin embargo, los vectores derivados de MLV han mostrado limitaciones importantes para aplicaciones clínicas, tales como escasa eficiencia en la transducción de las células HSCs y T que no encuentran en división, expresión insuficiente de productos anti-HIV potencialmente terapéuticos y propensión a inducir neoplasia por activación insercional de oncogenes (Baum et al., 2003).

35 Entre las posibles dianas de la terapia génica anti-HIV se encuentra el producto del gen del factor de infectividad viral (*vif*). *Vif* es uno de los cuatro genes accesorios de HIV-1, expresado en una fase tardía durante la replicación del virus de una manera dependiente de Rev (Cullen et al., 1998; Frankel et al., 1998). La proteína *Vif* se requiere para infectividad viral alta en las denominadas células 'no permisivas', que incluyen las dianas naturales de HIV-1 (células T y macrófagos) y algunas líneas de células T, por ejemplo, CEM, H9, y HUT 78 (Fisher et al., 1987; Fouchier et al., 1996; Gabuzda et al., 1992; Sheehy et al., 2002; Simon et al., 1996; von Schedler et al., 1993). Este requerimiento depende de la capacidad de *Vif* para contrarrestar la acción de la recién identificada proteína CEM15/APOBEC-3G (Sheehy et al., 2002) que confiere inmunidad innata a HIV-1. Así, la discapacitación, o la interferencia con la función de *Vif* podrían representar un enfoque terapéutico anti-HIV-1 alternativo.

45 F12-*vif* es un mutante natural de *vif*, que lleva 15 sustituciones de aminoácidos singulares, descubierto originalmente en la variante F12 no productora de HIV-1 (Federico et al., 1989; Carlini et al., 1992; Carlini et al., 1996). El HIV F12 no productor induce un bloqueo en la replicación de HIV superinfectante y F12-*Vif* puede jugar un papel en la infectividad reducida de este productor. Sin embargo, existe necesidad de proporcionar mutantes *vif* adicionales con actividad anti-HIV, y proporcionar sistemas de suministro eficaces para estos mutantes. La presente invención trata de resolver estos problemas.

Sumario de la Invención

50 Se han desarrollado nuevos mutantes de *vif* que son altamente eficaces en la inhibición de la replicación de HIV-1 in vitro en líneas de células T infectadas con HIV-1. En particular, se ha encontrado que una proteína *Vif* que comprende reemplazamiento de aminoácidos en los aminoácidos correspondientes a las posiciones 12, 28,130,131,132 y 142 de la secuencia de tipo salvaje es suficiente para ejercer efecto antiviral contra HIV. Además, se demuestra que una región de 45 aminoácidos de F12-*Vif* (Chim3), que lleva sólo 6 sustituciones singulares de aminoácidos, incrustadas en un contexto WT-*Vif*, protege los linfocitos T humanos contra la infección de HIV-1. 55 Adicionalmente, se muestra que, en contraste con F12-*Vif*, Chim3 no puede restablecer la replicación de viriones deficientes de *Vif* (Δvif HIV-1) en células no permisivas, haciendo el uso de este mutante mucho más seguro en situaciones en las cuales el mismo encuentra cuasiespecies Δvif HIV-1 alojadas de modo silencioso en un paciente.

Una ventaja asociada con una realización de la presente invención es que el transgén mutante *Vif* se encuentra bajo el control de la transcripción de una LTR de HIV-1 de tipo salvaje dependiente de Tat, que está activada sólo en las células infectadas por HIV-1, evitando así la expresión innecesaria de un antígeno extraño en HSCs transducidas y su progenie, es decir, que la expresión de HIV-1 se halla bajo control inducible por HIV-1.

5 Enunciados de la Invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica *Vif* en donde cada uno de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 127, 128, 130, 131, 132 y 142 de la secuencia en la Figura 1A son N, V, R, L, S e I respectivamente y en donde la totalidad de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 22, 29, 41, 66, 80, 109, 185 y 186 no son I, I, K, V, N, R, R y N, respectivamente.

Preferiblemente, la totalidad de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 22, 29, 41, 48, 66, 80, 109, 185 y 186 no son I, I, K, N, V, N, R, R y N, respectivamente.

En una realización, el aminoácido correspondiente a la posición 48 es N.

Preferiblemente, los aminoácidos correspondientes a las posiciones 22, 29, 41, 48, 66, 80, 109, 185 y 186 son los presentes en una *Vif* existente naturalmente, tales como, pero sin carácter limitante, HXB2 acc.#K03455, BRU acc.#K02013, SF2 acc.#K02007, PV22 acc.#K02083, MN acc.#M17449 y NL4-3 acc.#M19921 (véanse las Figuras 1A, 1B y 1C). Aminoácidos adecuados para estas posiciones son, pero sin carácter limitante, 22 (K), 29 (M), 41 (R), 48 (N o H), 66 (I), 80 (H), 109 (L), 185 (G), 186 (S). A este respecto, la secuencia de *vif* existente naturalmente no es F12-*vif*.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína *Vif* quimérica que comprende los aminoácidos 126 a 170 de la secuencia F12-*vif* en la Figura 2 incrustada en una secuencia *Vif* existente naturalmente, tal como, pero sin carácter limitante, HXB2 acc.#K03455, BRU acc.# K02013, SF2 acc.# K02007, PV22 acc.# K02083, MN acc.#M17449 y NL4-3 acc. # M19921 (véanse las Figuras 1A, 1B, 1C y 2). A este respecto, la secuencia de *Vif* existente naturalmente no es F12-*Vif*.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento del polipéptido *Vif* como se define arriba en donde el fragmento comprende al menos los aminoácidos correspondientes a 126 hasta 170 de la secuencia de la Figura 2.

Preferiblemente, el fragmento comprende al menos los aminoácidos 126 a 170 de la secuencia de la Figura 2.

En una realización, el fragmento consiste en los aminoácidos 126 a 170 de la secuencia de la Figura 2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido constituido por o que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada en Fig. 5A.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido constituido por o que comprende una secuencia de nucleótidos como se muestra en Fig. 15.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporcionan polipéptidos *Vif* y fragmentos de polipéptidos *Vif* codificados por los polinucleótidos de la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención.

Preferiblemente, el vector es un vector lentiviral recombinante.

Preferiblemente el vector lentiviral puede derivarse de HIV.

Preferiblemente, el vector codifica un polinucleótido de la presente invención que está enlazado operativamente a una LTR viral.

Preferiblemente, la expresión del polinucleótido es dependiente de *tat* y *rev*.

Preferiblemente el vector de la presente invención no comprende los genes *tat* y *rev*.

Preferiblemente el vector de la presente invención es capaz de expresar el mutante *Vif* o fragmento de mutante *Vif* bajo control inducible por HIV-1.

Preferiblemente, el vector de la presente invención carece de los genes *gag*, *pol* y *env*.

En una realización, el vector de la presente invención comprende adicionalmente una secuencia de polinucleótidos que codifica un gen marcador de selección.

Preferiblemente, el vector de la presente invención comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica al menos parte del receptor del factor de crecimiento de los nervios de afinidad baja (LNGFR).

- 5 En otra realización, el vector de la presente invención se encuentra en la forma de un provirus integrado.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula retroviral que puede obtenerse a partir del vector de la presente invención.

Preferiblemente, la partícula retroviral está pseudo-tipificada.

- 10 Preferiblemente, el polinucleótido que codifica el mutante Vif está enlazado operativamente a una repetición terminal larga (LTR) del virus.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un sistema de producción de retrovirus para producir la partícula retroviral de la presente invención que comprende el vector de la presente invención y *gag-pol* retroviral y *env* retroviral o no retroviral. En particular, el concepto de pseudotipificación es bien conocido en la técnica y puede utilizarse en la presente invención.

- 15 Preferiblemente, el *gag-pol* retroviral y *env* se encuentran en vectores diferentes.

Preferiblemente, la proteína de la envoltura se selecciona del grupo constituido por RD114-TR, VSV-G, GALV y 4070A.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una célula que comprende un polinucleótido de la presente invención.

- 20 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una célula infectada o transducida con un vector de la partícula retroviral de la presente invención.

Preferiblemente la célula es una célula T.

Preferiblemente, la célula es un monocito, macrófago o linfocito.

Preferiblemente, la célula es una célula hematopoyética precursora CD34+ o una célula hematopoyética.

- 25 Preferiblemente, la célula de la presente invención expresa el mutante Vif bajo control inducible por HIV-1.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido, un polipéptido, un vector, una partícula retroviral o una célula de la presente invención para uso en medicina.

- 30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido, un polipéptido, un vector, una partícula retroviral o una célula de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de un polinucleótido, un polipéptido, un vector, una partícula retroviral, una célula o una composición farmacéutica de la presente invención para la preparación de un medicamento para tratamiento o prevención de la infección de HIV o afecciones afines. La infección de HIV puede representar superinfección.

- 35 Se describe también en esta memoria un método de tratamiento o prevención de la infección de HIV o afecciones afines que comprende administrar a un paciente que se encuentra en necesidad de ello una cantidad eficaz de un polipéptido, un polinucleótido, un vector, una partícula retroviral, una célula o una composición farmacéutica de la presente invención.

- 40 Se describe también en esta memoria un método de tratamiento o prevención de la infección de HIV o una afección afín que comprende infectar o transducir una célula con un vector o una partícula retroviral de la presente invención.

La infección o transducción puede efectuarse *ex vivo* y la célula se introduce en un paciente.

Descripción de las Figuras

- 45 La Figura 1A muestra la secuencia de consenso de aminoácidos de tipo salvaje (WT) generada por cinco secuencias de aminoácidos de Vif (HXB2 acc.# K03455, BRU acc.# K02013, SF2 acc.# K02007, PV22 acc.# K02083, MN acc.# M17449). Los números de acceso se refieren a GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>).

La figura 1B muestra la alineación de las cinco secuencias de aminoácidos de Vif, la secuencia de consenso generada y la secuencia F12-Vif.

La Figura 1C muestra la secuencia de aminoácidos WT Vif de NL4-3.

5 La Figura 2 muestra la secuencia del polipéptido HIV-F12-Vif (número de acceso NCBI:Z11530) de HIV-1-F12. Las sustituciones singulares de aminoácidos se representan en negrita.

La Figura 3A muestra la secuencia del polipéptido Chim1. Los aminoácidos en negrita representan aminoácidos de reemplazamiento con respecto a Vif de tipo salvaje (NL4-3).

La Figura 3B resalta las porciones de Chim1 que corresponden a F12-Vif (cursiva) y a Vif de tipo salvaje.

10 La Figura 4A muestra la secuencia del polipéptido Chim2. Los aminoácidos en negrita representan aminoácidos de reemplazamiento con respecto a Vif de tipo salvaje (NL4-3).

La Figura 4B resalta las porciones de Chim2 que corresponden a F12-Vif (cursiva) y a Vif de tipo salvaje.

La Figura 5A muestra la secuencia de polipéptido Chim3. Los aminoácidos en negrita representan aminoácidos de reemplazamiento con respecto a Vif de tipo salvaje (NL4-3).

En la Figura 5B resalta las porciones de Chim3 que corresponden a F12-Vif (cursiva) y a Vif de tipo salvaje.

15 La Figura 6 muestra una representación esquemática de los vectores lentivirales basados en HTV-1PΔN, WT-Vif PΔN, F12-VifPΔN, Chim1-PΔN, Chim2-PΔN y Chim3-PΔN en su forma proviral.

La Figura 7 muestra el análisis de la expresión de Chim1, Chim2 y Chim3 en comparación con las proteínas de longitud total WT- y F12-Vif por el ensayo de transferencia Western.

20 La Figura 8 muestra la actividad antiviral de las proteínas quiméricas en líneas de células T. A. Células NP CEM A3.01 transducidas falsamente (Falso) y células F12-Vif- y Chim3PΔN transducidas se infectaron con el clon molecular X4 HIV-1 NL4-3 a la MOI de 0,1. Se muestran las medias de los valores triplicados medidos en el pico de una cinética de infección (día 15) por ensayo RT. B. Cinética de infección de células CEMss permisivas transducidas falsamente y transducidas con LV, infectadas con el X4 HIV-1 NL4-3 a la MOI de 0,1. C. Células permisivas SupT-1 transducidas falsamente y transducidas con LV infectadas con el X4 HIV-1 NL4-3 a la MOI de 0,1. D. Células PM1
25 no permisivas transducidas falsamente y transducidas con Chim3PΔN se infectaron con el R5 HIV-1 AD8 a la MOI de 0,1 y se midió la actividad RT 6 días después de la infección.

La Figura 9 muestra la actividad antiviral de Chim3 en linfocitos T CD4+. Linfocitos T CD4+ derivados de cordón umbilical transducidos falsamente y transducidos con LVs se infectaron con el X4 HIV-1 NL4-3 (**A**) o el clon molecular R5 HIV-1 AD8 a la MOI de 0,1 (**B**).

30 La Figura 10 muestra la cinética de la replicación de HIV-1 en células CEM A3.01 transducidas con los vectores lentivirales indicados e infectadas luego con HIV-1_{NL4-3} a la MOI de 0,1.

La Figura 11 demuestra que Chim3 no restablece la replicación de X4 y R5 Δvif HIV-1 en linfocitos T CD4+. Linfocitos T CD4+ transducidos falsamente o transducidos con LVs se infectaron con los clones moleculares X4Δvif-HIV (**A**) y R5 HIV-1 AD-1 vif (**B**) a la MOI de 0,1. El crecimiento de HIV-1 se siguió durante 39 y 29 días, respectivamente.
35

La Figura 12 muestra la ventaja selectiva de las células transducidas con F12-Vif y Chim3 sobre las células transducidas falsamente después de infección de HIV-1. Las células CEM A3.01 transducidas con LVs y transducidas falsamente se mezclaron y se cultivaron a la ratio de 50:50 y se infectaron luego con el X4 HIV-1 NL4-3 a la MOI de 0,01. El porcentaje de incremento de células transducidas (células NGFR+) se calculó el día 20 después de la infección entre las células infectadas y no infectadas.
40

La Figura 13 muestra la expresión menor de Chim2 y Chim3 comparada con WT-Vif y que Chim3 es degradada más eficientemente por los proteasomas en células no permisivas que en células permisivas. **A.** Análisis por transferencia Western del nivel basal de Vif y proteínas hA3G en células no permisivas CEM A3.01 o células permisivas SupT-1 falsamente transducidas y transducidas con LV. **B.** Análisis por transferencia Western de extractos de células enteras derivados de células permisivas no infectadas (SupT-1) o no permisivas (CEM A3.01) tratadas durante 18 horas con el inhibidor de proteasomas MG132. Se sondaron filtros secuencialmente con el anti-Vif, anti-hA3G (sólo en células no permisivas) y Abs anti-actina. **C.** La multiplicidad de incremento de proteínas Vif se calculó por medida de la intensidad de las bandas con o sin tratamiento de MG132 y normalización para cantidad igual de proteína con las bandas de actina. Se hicieron cuantificaciones sobre tres experimentos independientes.
45

50 La Figura 14 muestra la acumulación de mRNA de Chim3 después de tratamiento con cicloheximida en células no permisivas. **A.** Se extrajo el RNA total (10 µg) de células CEM A3.01 no permisivas y el RNA fraccionado se hibridó

luego con la sonda NGFR. **B.** Se extrajo el RNA total de células CEM A3.01 no permisivas tratadas o no con cicloheximida (10 µg/ml) durante 8 horas y el RNA fraccionado se hibridó luego con la sonda NGFR. **C.** La multiplicidad de incremento de mRNA de Vif se calculó por cuantificación con Phosphorimager de las bandas relativas normalizadas sobre las bandas de NGFR.

5 La Figura 15 muestra la secuencia del polinucleótido Chim3.

La Figura 16 muestra las secuencias del polinucleótido Chim2.

La Figura 17 muestra la secuencia del polinucleótido WT Vif de NL4-3..

La Figura 18 muestra la secuencia del polinucleótido F12-Vif.

Descripción detallada

10 Se describirán ahora diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención.

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, DNA recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Véase por ejemplo J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 15 Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA* 20 *Methods in Enzymology*, Academic Press.

Células diana

Los polipéptidos, polinucleótidos, vectores, partículas retrovirales, células o composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden suministrarse a una célula diana. Preferiblemente, la célula es una célula del sistema 25 inmunitario, v.g. una célula T. Preferiblemente, la célula es una célula del sistema inmunitario humano. Aún más preferiblemente, la célula es una célula que es susceptible de ser infectada por HIV, es decir una célula HIV-permisiva. Células en las cuales puede introducirse el vector o partícula lentiviral recombinante de la presente invención incluyen linfocitos de sangre periférica, monocitos, macrófagos y astrocitos.

Factor de Infectividad Viral (Vif)

30 Debe indicarse que en esta solicitud las posiciones de los aminoácidos se identifican por aquéllas que corresponden a una posición particular en la secuencia de consenso de la Figura 1A. Esto no debe interpretarse con el significado de que las secuencias de la presente invención tengan que incluir secuencias presentes en la Figura 1A. Una persona experta apreciará fácilmente que las secuencias Vif varían entre cepas HIV diferentes. La referencia a esta figura se utiliza meramente para permitir la identificación de una localización particular de aminoácido dentro de cualquier proteína Vif particular. Tales localizaciones de aminoácidos pueden identificarse rutinariamente utilizando 35 programas de alineación de secuencias, cuyos usos son bien conocidos en la técnica.

Los lentivirus tales como HIV-1 codifican cierto número de genes accesorios además de los genes estructurales gag, pol y env que son expresados por todos los retrovirus competentes en replicación. Uno de estos genes accesorios, vif (factor de infectividad viral), es expresado por todos los lentivirus conocidos excepto el virus de la anemia 40 infecciosa de los equinos. La proteína VIF es una proteína altamente básica de 23 kDa compuesta de 192 aminoácidos. El análisis de la secuencia del DNA viral de los individuos infectados por HIV-1 ha revelado que el marco de lectura abierto de Vif se mantiene intacto. (Sova, et al., 1995; Wieland et al., 1994; Wieland et al., 1997). En condiciones relativamente nativas, las proteínas Vif forman multímeros *in vitro*, que incluyen dímeros, trímeros o tetrámeros. Se ha demostrado también que las proteínas Vif pueden interactuar unas con otras dentro de una 45 célula. Estudios ulteriores han indicado que el dominio que afecta a la auto-asociación de Vif está localizado en el término C de esta proteína, especialmente en la región 151-164 enriquecida en prolina (Yang et al., 2001).

La delección del gen Vif reduce espectacularmente la replicación del virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV) en los macacos y la replicación VIH-1 en los ratones SCD-hu (Aldrovandi, G. M. & Zack, J. A., *J. Virol.* 70:1505-1511, 1996; Desrosiers, R. C., et al., *J. Virol.* 72:1431-1437, 1998), lo que indica que aquél es esencial para la replicación patógena de los lentivirus in vivo. Hallazgos previos han respaldado un papel de Vif en la integración del DNA 50 proviral (Simon et al., 1996; von Schwedler et al., 1993; Sova et al., 2001). Se ha demostrado también que Vif interacciona con el RNA genómico (Zhang et al., 2000; Dettenhofer et al., 2000) o proteínas virales y celulares tales como el complejo HP-68-Gag, que está implicado en la fase tardía del ensamblaje de la cápsida (Zimmerman et al., 2002).

La infectividad incrementada de Vif es conferida en la célula productora de virus, pero se manifiesta únicamente en sí misma en la célula diana. Los provirus de Vif pueden complementarse por tanto en trans en las células productoras de virus, pero no en las células diana. Adicionalmente, el requerimiento de Vif es específico del tipo de célula. Los virus *vif* exhiben un fenotipo negativo cuando se producen a partir de linfocitos T primarios, macrófagos diferenciados terminalmente, o un pequeño número de líneas de células linfoides T, tales como H9. A estas células se hace referencia como células "no permisivas". En algunas líneas de células T tales como SupT1, C8166, y otras células distintas de células T tales como células HelaCD4, sin embargo, puede conseguirse una replicación productiva de virus *vif* HIV-1. A estas líneas de células se hace referencia como células "permissivas" (Gabuzda et al., 1992; von Schwedler et al., 1993; Gabuzda et al., 1994). Este requerimiento depende de la capacidad de Vif para contrarrestar la acción de la proteína recién identificada CEM15/APOBEC-3G (Sheehy et al., 2002) que se expresa selectivamente en células no permisivas, y que confiere inmunidad innata a HIV-1. APOBEC-3G es una proteína celular citidina-desaminasa incorporada en los viriones deficientes en *vif* (Δvif HIV-1) durante la producción viral, que induce hiper-mutación masiva de G a A en el cDNA naciente de la cadena más durante la transcripción inversa en las células infectadas que conduce a una inhibición fuerte de la replicación variante de HIV-1 Δvif (Lecossier et al., 2003; Harris et al., 2003; Mariani et al., 2003; Goff et al., 2003). Mientras que el miembro fundador original de la familia de genes, APOBEC, actúa sobre el RNA y desamina solamente un residuo citosina simple en su mRNA de la apolipoproteína B diana para regular su expresión (Teng et al., 1998), APOBEC-3G es activo en lugar de ello sobre el DNA monocatenario y es mucho más potente. Como resultado de su actividad, aproximadamente 1% a 2% de todos los residuos citosina en el DNA viral se convierten en uracilo. Después del ataque por APOBEC-3G, la desaminación genera o bien un DNA altamente mutado incapaz de expansión viral o, por desencadenamiento de un camino de escisión basado en uracilo, impide la acumulación de cDNA en las células diana. Alternativamente, el número incrementado de uracilos en la cadena menos podría deteriorar la iniciación de la síntesis de la cadena más.

El mecanismo de acción por el cual Vif bloquea APOBEC-3G no está todavía completamente esclarecido. Sin embargo, se ha demostrado que Vif reduce significativamente el nivel de la proteína APOBEC-3G encapsulada en los viriones. Para excluir el APOBEC-3G de los viriones, Vif podría enmascarar el dominio de APOBEC-3G que interacciona con los viriones de ensamblamiento; podría alejar APOBEC-3G del sitio en la célula en que se ensambla el virus; o podría inducir degradación de APOBEC-3G. Existen evidencias que sugieren que el papel fundamental de Vif es inducir la degradación dependiente de proteasomas de APOBEC-3G y permitir por consiguiente la replicación de HIV-1 (Navarro et al., 2004; Trono, 2004). La degradación de APOBEC-3G es secundaria a su ubiquitinación por Vif, que forma un puente funcional entre APOBEC-3G y un complejo de ubiquitina-ligasa E3 a través de la secuencia C-terminal SOCS (Addo et al., 2003, y Harris et al., 2003).

La expresión de componentes virales, con inclusión de proteínas y ácidos nucleicos virales, no se altera en los viriones producidos por células no permisivas. (Fouchier et al., 1996; Gabuzda et al., 1992; von Schwedler et al., 1993). La delección del gen *vif*, sin embargo, da como resultado alteraciones de la morfología del virión (Borman et al., 1995; Bouyac et al., 1997; Høglund et al., 1994).

Un mutante natural de Vif (F12-Vif), que lleva 15 sustituciones de aminoácidos singulares, identificadas originalmente en la variante F12 de HIV-1 (Federico et al., 1989), un provirus no productor clonado a partir de células HUT 78 infectadas con un aislado primario de HIV-1 exhibe actividad anti-HIV-1 (D'Aloja et al., 1998).

Se han desarrollado mutantes nuevos de *vif* que son altamente eficaces en la inhibición de la replicación de HIV-1 in vitro en líneas de células T infectadas con HIV-1. Más específicamente, se ha encontrado que no es necesario proteger la secuencia de longitud total de F12-Vif contra la infección de HIV. De hecho, se ha demostrado que una región de 45 aminoácidos de F12-Vif (F12-Vif-Chim3), que lleva sólo 6 sustituciones singulares de aminoácidos, incrustadas en un contexto de WT-Vif, protege los linfocitos T humanos contra la infección de HIV-1.

En diversos aspectos de la presente invención que se definen en las reivindicaciones, la proteína Vif puede ser una quimera de F12-Vif y una segunda proteína Vif, siendo preferiblemente la segunda proteína Vif una proteína Vif existente naturalmente. Por ejemplo, la segunda proteína Vif puede ser HXB2 acc.# K03455, BRU acc.# K02013, SF2 acc.# K02007, PV22 acc.# K02083, MN acc.#M17449 o NL4-3 acc. # M19921 Vif (véanse las Figuras 1A, 1B y 1C). En una realización, la segunda proteína Vif utilizada para producir la quimera no tiene ninguna de las 15 sustituciones de aminoácidos conservadas (a saber, en las posiciones 22, 29, 41, 48, 66, 80, 109, 127, 128, 130, 131, 132, 142, 185 y 186) presentes en F12-Vif. Preferiblemente, las porciones de la quimera que requiere las sustituciones específicas de F12-Vif se derivan de la proteína F12-Vif, derivándose el resto de la segunda proteína Vif. Se requieren sustituciones específicas de F12-Vif en las posiciones 127, 128, 130, 131, 132, y 142 (es decir, los aminoácidos en estos puntos son N, V, R, L, S e I, respectivamente), pero no en las posiciones 22, 29, 41, 48, 66, 80, 109, 185 y 186, por lo que la porción de la quimera que comprende al menos los aminoácidos 126 a 170 puede derivarse de F12-Vif, derivándose el resto de la segunda proteína Vif.

La proteína Vif de la presente invención puede producirse realizando mutaciones puntuales en las posiciones de los aminoácidos requeridas. Se requieren sustituciones específicas de F12-Vif en las posiciones 127, 128, 130, 131, 132 y 142 (es decir los aminoácidos en estos puntos son N, V, R, L, S, e I respectivamente) y tales mutaciones de acción específica (v.g. utilizando la técnica de solapamiento PCR (Taddeo et al., 1986)) pueden introducirse en un Vif existente naturalmente (v.g. NL4-3) en estas posiciones.

La proteína Vif de la presente invención es una proteína Vif mutada o fragmento de la misma que, cuando se expresa en células diana, reduce o inhibe la replicación de HIV-1. La Vif mutante de la presente invención puede mutarse utilizando técnicas estándar de mutagénesis. Por mutagénesis se incluye también delección o sustitución. Pueden introducirse mutaciones de acción específica utilizando la técnica de solapamiento PCR (Taddeo et al., 1996). La capacidad de Vif mutante para impartir al menos cierta resistencia o super-resistencia a la infección de HIV puede determinarse por análisis de la replicación viral. Tales ensayos son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en D'Aloja. Alternativamente, un Vif mutante de HIV puede revertir al tipo salvaje y los productos resultantes pueden transfectarse en células HIV-permisivas. Un método de este tipo podría permitir la identificación de otras mutaciones útiles, haciendo posible con ello la identificación de mutantes adicionales.

10 HIV

Como se utiliza en esta memoria, HIV abarca todas las designaciones asignadas a aquellos virus implicados como agentes causantes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y complejo afín al SIDA (ARC), tales como HIV, v.g. HIV-1 y HIV-2, y HTLV, v.g. HTLV-III. De los dos tipos de HIV principales, HIV-1 y HIV-2, HIV-1 es la especie predominante en todo el mundo. Hasta la fecha, existen dos grupos principales de HIV-1, "M" y "O". Los virus que causan la gran mayoría de las infecciones de HIV-1 se encuentran en el grupo M. Los aislados del grupo O son genéticamente muy distantes del grupo M. Subtipos de HIV-1 del grupo M incluyen los subtipos A-J.

Polinucleótidos

Los polinucleótidos de la presente invención pueden comprender DNA o RNA. Los mismos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Se comprenderá por las personas expertas que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Adicionalmente, debe entenderse que las personas expertas pueden, utilizando técnicas de rutina, realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia del polipéptido codificado por los polinucleótidos utilizados en la invención para reflejar el uso de codones de cualquier organismo hospedador particular en el cual deban expresarse los polipéptidos. Los polinucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con objeto de mejorar la actividad *in vivo* o duración de vida de los polinucleótidos de la invención.

Los polinucleótidos tales como polinucleótidos de DNA pueden producirse recombinantemente, por síntesis, o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. Los mismos pueden clonarse también por técnicas estándar.

Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación PCR (re acción en cadena de la polimerasa). Esto implicará la preparación de un par de iniciadores (v.g. de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanqueen una región de la secuencia diana de DNA que se desea clonar, puesta en contacto de los iniciadores de mRNA o cDNA obtenidos a partir de una célula animal o humana, realización de una re acción en cadena de polimerasa en condiciones que producirán la amplificación de la re acción deseada, aislamiento del fragmento amplificado (v.g. por purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperación del DNA amplificado. Los iniciadores pueden diseñarse en cuanto a contenido de sitios de reconocimiento por enzimas de restricción adecuadas a fin de que el DNA amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Proteínas

Como se utiliza en esta memoria, el término "proteína" incluye moléculas de polipéptidos monocatenarias así como complejos de polipéptidos múltiples en los cuales los polipéptidos individuales constituyentes están unidos por medios covalentes o no covalentes. Como se utiliza en esta memoria, los términos "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero en el cual los monómeros son aminoácidos y están unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces disulfuro. Los términos subunidad y dominio pueden hacer referencia también a polipéptidos y péptidos que tienen función biológica.

Variantes, Derivados, Análogos, Homólogos y Fragmentos

Además de las proteínas y ácidos nucleicos específicos mencionados en esta memoria, se describen también variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos de los mismos.

Una variante de cualquier secuencia dada es una secuencia en la cual la secuencia específica de residuos (sean residuos de aminoácidos o de ácidos nucleicos) ha sido modificada de tal manera que el polipéptido o polinucleótido en cuestión retiene al menos una de sus funciones endógenas. Una secuencia variante puede modificarse por reemplazamiento de adición, delección, modificación por sustitución, y/o variación de al menos un residuo presente en la proteína existente naturalmente.

El término "derivado", como se utiliza en esta memoria, en relación con las proteínas o polipéptidos como se ha descrito, incluye cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, delección de y/o adición

de uno (o más) residuos de aminoácidos de o a la secuencia con tal que la proteína o polipéptido resultante retenga al menos una de sus funciones endógenas.

El término "análogo" como se utiliza en esta memoria, en relación con los polipéptidos o polinucleótidos incluye cualquier mimético, es decir, un compuesto químico que posee al menos una de las funciones endógenas de los polipéptidos o polinucleótidos que mimetiza el mismo.

5 Típicamente, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo a partir de 1, 2 ó 3 a 10 ó 20 sustituciones, con tal que la secuencia modificada retenga la actividad o capacidad requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos no existentes naturalmente.

10 Las proteínas pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una proteína funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones deliberadas de aminoácidos sobre la base de semejanza en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilia, y/o en la naturaleza anfipática de los residuos con tal que se retenga la función de transporte o modulación. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofilia similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina.

15 Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la Tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse unos por otros:

ALIFÁTICOS	Non-polares	G A P
		I L V
	Polares - sin carga	C S T M
		N Q
	Polares - con carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

20 Los "fragmentos" son también variantes y el término hace referencia típicamente a una región seleccionada del polipéptido o polinucleótido que presenta interés sea funcionalmente o, por ejemplo, en un ensayo. "Fragmento" se refiere así pues a una secuencia de aminoácido o ácido nucleico que es una porción de un polipéptido o polinucleótido de longitud total.

25 Variantes de este tipo pueden prepararse utilizando técnicas estándar de DNA recombinante tales como mutagénesis orientada. En los casos en que deben hacerse inserciones, DNA sintético que codifica la inserción junto con regiones flanqueantes 5' y 3' correspondientes a la secuencia existente naturalmente a cualquiera de los lados del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes correspondientes a sitios en la secuencia existente naturalmente de tal modo que la secuencia pueda cortarse con la enzima o enzimas apropiadas y el DNA sintético pueda ligarse en el corte. El DNA se expresa luego de acuerdo con la invención para producir la proteína codificada. Estos métodos son únicamente ilustrativos de los numerosos métodos estándar conocidos en la técnica para manipulación de secuencias de DNA, pudiendo utilizarse también otros métodos conocidos.

30 Las variantes de polinucleótidos comprenderán preferiblemente secuencias de codones optimizadas. La optimización de codones se conoce en la técnica como método para mejorar la estabilidad del RNA y por consiguiente la expresión génica. La redundancia del código genético significa que varios codones diferentes pueden codificar el mismo aminoácido. Por ejemplo, leucina, arginina y serina son codificados cada uno de ellos por seis codones diferentes. Diferentes organismos muestran preferencias en su uso de los diferentes codones. Virus tales como HIV, por ejemplo, utilizan un gran número de codones raros. Por cambio de una secuencia de nucleótidos de tal modo que los codones raros se reemplazan por los codones de mamífero correspondientes utilizados comúnmente, puede conseguirse una expresión incrementada de las secuencias en células diana de mamífero. Se conocen tablas de uso de codones en la técnica para células de mamífero, así como para una diversidad de otros organismos. Preferiblemente, al menos parte de la secuencia está optimizada en codones. Aún más preferiblemente, la secuencia está optimizada en codones en su totalidad.

45 Vectores

5 Como es bien conocido en la técnica, un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad desde un ambiente a otro. De acuerdo con la presente invención, y a modo de ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de DNA recombinante permiten que entidades, tales como un segmento de DNA (tal como un segmento de DNA heterólogo, tal como un segmento de cDNA heterólogo), se transfieran a un hospedador y/o una célula diana para el propósito de replicar los vectores que comprenden las secuencias de nucleótidos utilizadas en la invención y/o que expresan las proteínas utilizadas en la invención. Ejemplos de vectores utilizados en técnicas de DNA recombinante incluyen pero sin carácter limitante plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales o virus.

10 Los polinucleótidos de la invención se incorporan preferiblemente en un vector. Preferiblemente, el polinucleótido está enlazado operativamente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula hospedadora, es decir que el vector es un vector de expresión. El término "enlazado operativamente" significa que los componentes descritos se encuentran en una relación que permite que los mismos funcionen en su modalidad propuesta. Una secuencia reguladora "enlazada operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

15 Las secuencias de control pueden modificarse, por ejemplo por la adición de elementos reguladores adicionales de la transcripción para hacer el nivel de transcripción dirigido por las secuencias de control más sensible a los moduladores de la transcripción.

20 Los vectores de la presente invención pueden ser, por ejemplo, vectores plasmídicos o vectores de virus provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de un polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, y/o un marcador rastreable tal como GFP. Pueden utilizarse vectores, por ejemplo, para transfectar o transformar una célula hospedadora.

25 Secuencias de control enlazadas operativamente a secuencias codificantes de proteínas de la presente invención incluyen promotores/intensificadores y otras señales reguladoras de la expresión. Estas secuencias de control pueden seleccionarse de modo que sean compatibles con la célula hospedadora para la cual está diseñada la utilización del vector de expresión. El término "promotor" es bien conocido en la técnica y abarca regiones de ácido nucleico de tamaño y complejidad que van desde promotores mínimos a promotores que incluyen elementos aguas arriba e intensificadores.

30 El control se selecciona típicamente de promotores que son funcionales en células de mamífero, aunque pueden utilizarse promotores procariotas y promotores funcionales en otras células eucariotas. El promotor se deriva típicamente de secuencias promotoras de genes virales o eucariotas. Por ejemplo, puede tratarse de un promotor derivado del genoma de una célula en la cual debe producirse la expresión. Con respecto a los promotores eucariotas, los mismos pueden ser promotores que funcionan de una manera ubicua (tales como promotores de α -actina, β -actina, tubulina) o, alternativamente, de una manera específica de tejido (tales como los promotores de los genes para piruvato-quinasa). Pueden utilizarse también promotores virales, por ejemplo el promotor de la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) o el promotor IE del citomegalovirus humano (CMV).

40 Puede ser también ventajoso que los promotores sean inducibles de tal modo que los niveles de expresión del gen heterólogo puedan regularse durante el periodo de vida de la célula. Inducible significa que los niveles de expresión obtenidos usando el promotor pueden regularse.

Adicionalmente, cualquiera de estos promotores puede modificarse por la adición de secuencias reguladoras posteriores, por ejemplo secuencias intensificadoras. Pueden utilizarse también promotores quiméricos que comprenden los elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes arriba descritos.

45 El vector de la presente invención puede ser un vector basado en retrovirus que ha sido modificado mente de tal modo que el mismo no puede replicarse ni producir partículas de virus de progenie infecciosas una vez que el virus ha entrado en la célula diana.

Retrovirus

50 Han sido identificados un gran número de retrovirus diferentes. Ejemplos incluyen: el virus de la leucemia murina (MLV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus de la inmunodeficiencia de los simios (el virus de la leucemia de las células T humanas (HT-LV), el virus de la anemia infecciosa de los equinos (EIAV), el virus del tumor mamario del ratón (MMTV), el virus del sarcoma de Rous (RSV), el virus del sarcoma de Fujinami (FuSV), el virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV), el virus del osteosarcoma murino FBR (FBR MSV), el virus del sarcoma murino de Moloney (Mo-MSV), el virus de la leucemia murina de Abelson (A-MLV), el virus 29 de la mielocitomatosis aviar (MC29), y el virus de la eritroblastosis aviar (AEV). Una lista detallada de retrovirus puede encontrarse en Coffin et al., 1997, "Retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763.

Detalles acerca de la estructura genómica de algunos retrovirus pueden encontrarse en la técnica. A modo de ejemplo, detalles sobre HIV y Mo-MLV pueden encontrarse en el Genbank de NCBI (Núms. de Acceso al Genoma AF033819 y AF033811, respectivamente).

5 Los retrovirus pueden dividirse ampliamente en dos categorías: a saber, "simples" y "complejos". Los retrovirus pueden dividirse ulteriormente además en 7 grupos. Cinco de estos grupos representan retrovirus con potencial oncogénico. Los dos grupos restantes son los lentivirus y los espumavirus. Una revisión de estos retrovirus se representa en Coffin et al., 1997 (*Ibid*).

10 Cada genoma retroviral comprende genes denominados *gag*, *pol* y *env*, que codifican proteínas del virión y enzimas. En el provirus, estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones denominadas repeticiones terminales largas (LTRs). Las LTRs son responsables de la integración proviral, y la transcripción. Las LTRs sirven también como secuencias intensificadoras-promotoras y pueden controlar la expresión de los genes virales. La encapsidación de los RNAs retrovirales ocurre en virtud de una secuencia *psi* localizada en el extremo 5' del genoma viral.

15 Las LTRs propiamente dichas son secuencias idénticas que pueden dividirse en tres elementos, que se denominan U3, R y U5. U3 se deriva de la secuencia exclusiva para el extremo 3' del RNA. R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del RNA, y U5 se deriva de la secuencia exclusiva para el extremo 5' del RNA. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus.

20 La organización molecular básica de un genoma de RNA retroviral infeccioso es (5') R - U5 - *gag*, *pol*, *env* - U3 - R (3'). En un genoma vector retroviral defectivo *gag*, *pol* y *env* pueden estar ausentes o ser o no funcionales. Las regiones R en ambos extremos del RNA son secuencias repetidas. U5 y U3 representan secuencias exclusivas en los extremos 5' y 3' del genoma de RNA respectivamente.

25 La gama de hospedadores y el tropismo de tejidos varía entre diferentes retrovirus. En algunos casos, esta especificidad puede restringir el potencial de transducción de un vector retroviral recombinante. Por esta razón, muchos experimentos de terapia génica han utilizado MLV. Un MLV particular que tiene una proteína de la envoltura denominada 4070A es conocido como un virus anfotrópico, y éste puede infectar también células humanas debido a que su proteína de la envoltura "se acopla" con una proteína de transporte de fosfato que está conservada entre hombre y ratón. Este transportador es ubicuo y por consiguiente estos virus son capaces de infectar muchos tipos de células.

30 Sin embargo, en algunos casos puede ser beneficioso, especialmente desde un punto de vista de seguridad, direccionar específicamente células restringidas. El reemplazamiento del gen *env* con un gen *env* heterólogo es un ejemplo de una técnica o estrategia utilizada para direccionar específicamente ciertos tipos de células. Esta técnica se conoce como pseudotipificación.

35 El término "vector retroviral recombinante" (RRV) hace referencia a un vector con información genética retroviral suficiente para permitir el empaquetamiento de un genoma de RNA, en presencia de componentes de empaquetamiento, en una partícula viral capaz de infectar una célula diana. La infección de la célula diana incluye transcripción inversa e integración en el genoma de la célula diana. El RRV en uso lleva típicamente secuencias codificantes no virales que deben ser suministradas por el vector a la célula diana. Un RRV es incapaz de replicación independiente para producir partículas retrovirales infecciosas en la célula diana final. El "vector retroviral recombinante" de la presente invención se deriva de un vector lentiviral. Expuesto de otro modo, el vector retroviral recombinante de la presente invención es un "vector recombinante lentiviral".

40 En un vector recombinante lentiviral típico para uso en terapia génica, al menos parte de una o más de las regiones codificantes de las proteínas *gag*, *pol* y *env* esenciales para la replicación pueden retirarse del virus. Esto hace el vector retroviral defectivo en replicación. Las porciones eliminadas pueden reemplazarse luego por el polinucleótido de la presente invención para generar un virus capaz de integrar su genoma en un genoma hospedador, pero en el cual el genoma viral modificado es incapaz de propagarse por sí mismo debido a una falta de proteínas estructurales. Cuando se integra en el genoma hospedador, tiene lugar la expresión del polinucleótido - dando como resultado, por ejemplo, un efecto terapéutico y/o diagnóstico. Así, la transferencia de un polinucleótido - dando como interés se consigue típicamente por: integración del polinucleótido en el vector viral recombinante; empaquetamiento del vector viral modificado en una cubierta del virión; y permisión de la transducción de una célula diana.

50 Los vectores retrovirales defectivos en replicación se propagan típicamente, por ejemplo para preparar títulos adecuados del vector retroviral para transducción subsiguiente, utilizando una combinación de una línea de células de empaquetamiento o adyuvante y el vector recombinante. Es decir, que las tres proteínas de empaquetamiento pueden proporcionarse en *trans*.

55 Una "línea de células de empaquetamiento" contiene uno o más de los genes retrovirales *gag*, *pol* y *env*. La línea de células de empaquetamiento produce las proteínas requeridas para empaquetamiento del DNA retroviral, pero no puede producir la encapsidación debido a la falta de una región *psi*. No obstante, cuando se introduce un vector recombinante que lleva un polinucleótido y una región *psi* en la línea de células de empaquetamiento, las proteínas

adyuvantes pueden empaquetar el vector recombinante *psi*-positivo para producir el stock de virus recombinante. Este stock de virus puede utilizarse para transducir células a fin de introducir el polinucleótido en el genoma de las células diana.

5 El virus recombinante cuyo genoma carece totalmente de los genes requeridos para producir proteínas virales puede transducirse una sola vez y no puede propagarse. Estos vectores virales que son únicamente capaces de una sola tanda de transducción de las células diana se conocen como vectores defectivos en replicación. En este caso, el polinucleótido se introduce en el genoma de la célula hospedadora/diana sin la generación de retrovirus potencialmente dañinos. Un sumario de las líneas de empaquetamiento disponibles se presenta en Coffin et al., 1997 (*Ibid*).

10 Preferiblemente se utilizan líneas de células de empaquetamiento retrovirales en las cuales las regiones codificantes virales *gag*, *pol* y *env* se transportan en plásmidos de expresión separados que se transfectan independientemente en una línea de células de empaquetamiento. Esta estrategia, a la que se hace referencia a veces como el método de transfección de tres plásmidos (Soneoka et al., 1995), reduce el potencial para producción de un virus competente en replicación dado que se requieren tres sucesos recombinantes para la producción del virus de tipo salvaje. Puesto que la recombinación se ve facilitada notablemente por la homología, la reducción o eliminación de la homología entre los genomas del vector y el adyuvante puede utilizarse también para reducir el problema de producción de virus adyuvantes competentes en replicación.

20 Una alternativa a las líneas de células de empaquetamiento transfectadas de manera estable consiste en la utilización de líneas de células transfectadas transitoriamente. Pueden utilizarse ventajosamente transfecciones transitorias para medir los niveles de producción de vectores cuando se están desarrollando vectores. A este respecto, la transfección transitoria evita el tiempo más largo requerido para generar líneas de células estables productoras de vectores y puede utilizarse también si el vector o los componentes de empaquetamiento del retrovirus son tóxicos para las células. Componentes utilizados típicamente para generar vectores retrovirales incluyen un plásmido que codifica las proteínas *gag/pol*, un plásmido que codifica la proteína *env* y un plásmido que contiene el polinucleótido. La producción de vectores implica transfección transitoria de uno o más de estos componentes en células que contienen los otros componentes requeridos.

Un enfoque para controlar la expresión del polipéptido de la presente invención consiste en utilizar la LTR 5' del retrovirus. La secuencia del polinucleótido puede enlazarse también operativamente a un promotor heterólogo interno. Esta disposición permite flexibilidad en la selección de promotores.

30 El grupo lentivirus puede dividirse en "primates" y "no-primates". Ejemplos de lentivirus de primate incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el agente causante del síndrome de la auto-inmunodeficiencia humana (SIDA), y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). El grupo de lentivirus de no-primates incluye el prototipo "virus lento" virus visna/maedi (VMV), así como el virus afín de la artritis-encefalitis de los caprinos (CAEV), el virus de la anemia infecciosa de los equinos (EIAV) y el virus de la inmunodeficiencia de los felinos (FIV) y el virus de la inmunodeficiencia de los bovinos (BIV), descritos más recientemente. Preferiblemente, el vector retroviral de la presente invención puede derivarse de HIV.

40 Una distinción entre la familia lentivirus y otros tipos de retrovirus es que los lentivirus tienen la capacidad de infectar tanto células en división como células que no se encuentran en división. En contraste, otros retrovirus - tales como MLV - son incapaces de infectar células que no encuentran en división, tales como las que constituyen, por ejemplo, músculo, cerebro, pulmón y tejido hepático.

45 Aun cuando la infección de las células que no se encuentran en división es una característica peculiar de los vectores de lentivirus, pueden proporcionarse condiciones específicas para una transducción a la vez estable y eficiente. Éstas incluyen la expresión de HIV-1 Vpr (Subbramianian et al., 1998; Vodicka et al., 1998), la presencia de secuencias del tracto de polipurinas de HIV-1 *pol* (PPT) (Follenzi et al., 2000), y el estado de activación de los cultivos monocitos/macrófagos (Re y Luban, 1997).

Una reducción significativa en la expresión constitutiva de vectores puede conseguirse por desensibilización de los mismos a la estimulación por TNF α , por ejemplo por delección/mutación de las secuencias sensibles a TNF α (es decir sitios de fijación NF-kB) en el vector promotor HIV-1 LTR.

50 Una dependencia más directa de la expresión de HIV-1 puede conseguirse también por diseño de un vector cuyos transcritos sufren retención nuclear y degradación en ausencia de la interacción Rev/RRE (Emerman et al., 1989; Malim et al., 1989). Adicionalmente, como ya se ha descrito para vectores retrovirales (Grignani et al., 1998), el uso de una nueva generación de vectores de lentivirus capaces de expresar el transgén sin integrarse en el genoma del hospedador podría alcanzar una importancia valiosa desde un punto de vista de bioseguridad.

55 La proteína Tat regula los niveles de expresión de los genes lentivirales. Debido a la débil actividad de transcripción basal de la repetición terminal larga (LTR), la expresión del provirus da inicialmente como resultado pequeñas cantidades de transcritos multi-remodelados que codifican las proteínas Tat, Rev y Nef. La proteína Tat aumenta espectacularmente la transcripción por fijación a una estructura tallo-bucle (elemento de respuesta a la

transactivación [TAR]) en el RNA naciente, reclutando con ello un complejo ciclina-quinasa que estimula la elongación de la transcripción por el complejo de polimerasas II. Preferiblemente, el polinucleótido de codifica Vif mutante se encuentra bajo el control de la LTR de HIV-1, que es activada por Tat y se expresa por tanto sólo cuando las células están infectadas por HIV-1. Este diseño del vector permite por tanto la minimización de la expresión de Vif en las células no infectadas, reduciendo con ello la inmunogenicidad, y se induce a niveles muy altos únicamente cuando las células están infectadas por HIV-1. Esto confiere una mejor protección con respecto a otros sistemas vectores.

En una realización, el vector lentiviral de la presente invención incluye un marcador seleccionable. Preferiblemente, el marcador seleccionable es el receptor truncado de baja afinidad del factor de crecimiento de los nervios (Δ LNGFR). El receptor de neurotrofina común, gen Receptor del Factor de Crecimiento de los Nervios de afinidad baja (LNGFR (al que se hace referencia también como p75NTR) no se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas humanas, permitiendo así el análisis cuantitativo de la expresión del gen transducido por inmunofluorescencia, con resolución de células simples. El análisis por el clasificador de células activadas por fluorescencia de la expresión de LNGFR puede realizarse en células transducidas para estudiar la expresión génica. Así, LNGFR puede utilizarse en la presente invención como marcador de selección. Detalles adicionales sobre el análisis utilizando LNGFR pueden encontrarse en Mavilio 1994. Un LNGFR truncado, Δ LNGFR, se describe en Mavilio 1994.

El marcador seleccionable puede estar enlazado operativamente a un promotor interno o expresarse a partir de la 5'LTR.

El vector lentiviral de la presente invención puede ser suministrado por células tales como monocitos, macrófagos, linfocitos o células troncales hematopoyéticas. Se utiliza particularmente un sistema de suministro dependiente de células. En este sistema, el vector lentiviral se introduce en una o más células *ex vivo* y la o las células se introducen luego en el paciente.

Los vectores lentivirales de la presente invención pueden administrarse solos, pero generalmente se administrarán como una composición farmacéutica.

Tratamiento

La presente invención se refiere a compuestos para uso en el tratamiento de la infección de HIV o afecciones afines. Debe apreciarse que todas las referencias a tratamiento en esta memoria incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico de enfermedades afines a HIV. Es particularmente preferido el tratamiento de mamíferos. Se describen tratamientos tanto humanos como veterinarios.

Así, los polinucleótidos, polipéptidos, vectores, partículas retrovirales, células y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse para efectuar la inmunización intracelular a fin de prevenir, o al menos inhibir sustancialmente, la infección inicial de HIV en un individuo que se encuentra en riesgo de sufrir una infección de este tipo. Los mismos pueden utilizarse también en el tratamiento terapéutico de un paciente HIV-positivo por bloqueo, o al menos ralentización de la propagación de la infección, y la prevención, o al menos el retardo, de la aparición de SIDA o ARC.

Se describe un método para impartir resistencia a la infección o superinfección de HIV que comprende retirar una célula HIV-permisiva de un paciente, transducir la células con el vector lentiviral de la presente invención a fin de conseguir la integración del mutante Vif de HIV y reintroducir la célula en un paciente. Tales métodos *ex vivo* se describen en Ferrari et al., (1991). Alternativamente, el vector retroviral puede suministrarse a una célula *in vivo*.

La integración del vector lentiviral en genomas nucleares de células puede monitorizarse utilizando, v.g., PCR en asociación con la secuenciación o hibridaciones Southern.

Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica es una composición que comprende o está constituida por una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacéuticamente activo. La misma incluye preferiblemente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (con inclusión de combinaciones de los mismos). Vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985). La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con relación a la ruta de administración propuesta y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como el - o además del - vehículo, excipiente, o diluyente cualesquiera ligante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, y agente(s) solubilizante(s) adecuado(s).

Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, petrolatum, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, agentes tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume,

monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetrales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y análogos.

5 En caso apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por uno cualquiera o más de: inhalación, en la forma de un supositorio o pesario, tópicamente en forma de una loción, solución, crema, ungüento o polvo para
 10 espolvoreo, por el uso de un parche en la piel, oralmente en forma de tabletas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas o óvulos sea solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, las
 15 composiciones pueden utilizarse óptimamente en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la solución isotónica con la sangre. Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en la forma de tabletas o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

15 Pueden existir diferentes requerimientos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para ser suministrada utilizando una mini-bomba o por ruta mucosal, por ejemplo, como una pulverización nasal o aerosol para inhalación o solución ingerible, o por vía parenteral en la cual la composición está formulada por una forma inyectable, para suministro mediante, por ejemplo, una ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede estar diseñada para suministrarse por ambas rutas. Polinucleótidos/vectores que codifican componentes polipeptídicos para uso en infecciones de etiología viral pueden administrarse
 20 directamente como un constructo de ácido nucleico desnudo, que comprende preferiblemente además secuencias flanqueantes homólogas al genoma de la célula hospedadora. Cuando los polinucleótidos/vectores se administran como un ácido nucleico desnudo, la cantidad de ácido nucleico administrada puede estar comprendida típicamente en el intervalo de 1 µg a 10 mg, con preferencia de 100 µg a 1 mg.

25 La captura de constructos de ácido nucleico desnudo por células de mamífero se mejora por varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo aquéllas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos (por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectantes (por ejemplo Lipofectam™ y Transfectam™). Típicamente, los constructos de ácido nucleico se mezclan con el agente de transfección para producir una composición.

30 La composición de la presente invención puede utilizarse también en asociación con otros fármacos anti-retrovirales, en particular tratamientos anti-HIV tales como AZT y ddI.

Las rutas de administración y las dosis descritas tienen se proponen únicamente como orientación, dado que un especialista experto podrá determinar fácilmente la ruta de administración y la dosificación óptimas para cualquier paciente y afección particulares.

La presente invención se describirá a continuación por vía de ejemplos no limitantes.

35 Ejemplo 1 - Materiales y Métodos

Células

40 CEM A3.01 es un clon derivado de la línea de células CEM T-linfoblastoide, altamente sensible al efecto citopático de HIV-1 (Folks et al., 1985). Se cultivaron células CEM A3.01, CEM ss (Nara et al., 1988), Sup-T1 (Smith et al., 1984) y PM1 (Lusso et al., 1995) en RPMI 1640 complementado con 10% FCS (EuroClone Ltd, UK) y una combinación de penicilina, estreptomina y glutamina (PSG). Las células 293T de riñón humano se propagaron en Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) complementado con 10% FCS y PSG.

45 Se purificaron leucocitos neonatales humanos de sangre de cordón umbilical por centrifugación en un gradiente Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, Noruega). Se aislaron células T CD4+ por selección negativa utilizando el kit II de aislamiento de células T CD4+ (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA, EE.UU.). La pureza (mayor que 95%) y el fenotipo naif se confirmaron por citometría de flujo utilizando los Abs anti-CD4, anti-CD45RA y anti-CD45RO, respectivamente (BD Pharmingen™). Se cultivaron linfocitos T CD4+ durante 3 días en X-VIVO-15 (BioWhittaker, Cambrex Bio Science, Verviers, Bélgica) que contenía 10% de suero humano, 50 U/ml de IL-2 (Chiron, Emeryville, CA), 25 U/ml de IL-7 (ImmunoTools, Alemania) y en presencia del expansor de las células T CD3/CD28 Dynabeads (DynaL Lake Success, NY, EE.UU.) a la ratio de 0,5 cuentas/célula.

50 **Plásmidos**

Se generó el vector lentiviral PΔN por clonación de la casete PGK-ΔLNGFR, (Bonini et al., 1997) que codifica una forma truncada del receptor del factor de crecimiento de los nervios de afinidad baja (ΔLNGFR) bajo el control del promotor fosfogliceroquinasa (PGK), en los sitios *Clal/SaclI* del vector lentiviral pHR2 (Dull et al., 1998). Se obtuvieron los vectores F12-VifPΔN y VifPΔN por inserción de una secuencia vif amplificada por PCR, F12-vif de 611

pb o de tipo salvaje (WT) respectivamente en el sitio *ClaI* del vector PΔN. Se utilizaron los DNAs WT HIV-1_{NL4-3} (acc.#M19921), y F12-HIV-(acc.#Z11530) como moldes de PCR *vif* utilizando los iniciadores siguientes:

dir: 5'-GCAAAGAATCGATGGGATTATGGAAAA-CAG-3';

5 *inv*: 5'-CTCCTCTAATCGATGCTAGTGTCCATT-CATTG-3' (secuencia *ClaI* en negrita). Todos los fragmentos amplificados por PCR y las uniones de clonación se secuenciaron totalmente.

Se generaron, partiendo del vector lentiviral PΔN previamente descrito (Vallanti et al., 2005), tres vectores Chim1PΔN, Chim2PΔN y Chim3PΔN que llevaban genes *vif* quiméricos WT/F12. Chim1PΔN codifica los 87 primeros aminoácidos del terminal N de F12-*vif* y los 106 aminoácidos restantes de WT-*vif*, Chim2PΔN codifica una proteína quimérica en la cual los dos dominios se han intercambiado con respecto a Chim1PΔN, y finalmente Chim3PΔN codifica una proteína quimérica en la cual la región de los aminoácidos 126-170 de F12-*Vif* se ha insertado en una cadena principal WT-*Vif*. Los dos primeros genes quiméricos se obtuvieron utilizando como molde de la PCR el genoma de dos mutantes de clones moleculares NL4-3 de HIV-1 en los cuales se habían reemplazado los fragmentos *BSpmI-PfIM* (259 pb) y *PfIM/EcoRI* (440 pb) del genoma de F12-HIV, respectivamente. El tercer vector se generó por síntesis del DNA por Primm s.r.l (Milán, Italia). Los tres genes quiméricos se clonaron en el sitio *ClaI* en el vector vacío PΔN. Todos los fragmentos amplificados por PCR y las uniones de clonación se comprobaron por secuenciación. El F12-*Vif*PΔN y el WT-*Vif*PΔN se habían descrito previamente. El plásmido pCEM15:HA (Sheehy et al., 2002) era un obsequio de M. Malim (King's College, Londres, UK).

Producción de vectores lentivirales pseudo-tipificados

20 Se produjeron stocks de vectores lentivirales pseudo-tipificados por co-transfección transitoria de células 293T con el vector de transferencia, un constructo de empaquetamiento mínimo de segunda generación pCMVΔR8.74, que expresa Gag, Pol, Tat y Rev, y el plásmido pMD.G que codifica la glicoproteína de la envoltura de la estomatitis vesicular, VSV-G (Zufferey et al., 1997). Las células se sembraron a $0,4 \times 10^6$ /ml 24 horas antes de la transfección con los tres plásmidos a la ratio 2:1:3 por FugeneTM 6 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Los sobrenadantes se cosecharon 48-72 horas después de la transfección, se aclararon por centrifugación a baja velocidad (10 min a 1500 rpm), y se filtraron a través de un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro. Se calcularon los títulos de virus por transducción de las células con dilución seriada de los stocks de virus. La normalización de los stocks de virus se realizó utilizando el ensayo RT estandarizado y procedimientos ELISA p24 Ag (Coulter Corporation, Westbrook, ME).

Transducción y selección de las células ΔLNGFR-inmunes

30 Las células se transdujeron por espinoculación. Resumidamente, los sobrenadantes normalizados del ensayo RT de cada vector VSV-G pseudotipificado se incubaron con 1×10^6 células en un volumen final de 2 ml (MOI de 0,5 a 5), y se centrifugaron a 2200 rpm durante 1 hora en presencia de polibreno (8 μg/ml). Después de 48 horas, las células se lavaron con PBS y se añadió medio nuevo completo. La eficiencia de transducción se monitorizó al menos una semana después de la espinoculación por análisis citométrico de flujo de la expresión de ΔLNGFR (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA) utilizando el anticuerpo monoclonal anti-humano p75-LNGFR 20.4 (ATCC, Rockville, MD) y suero antirratón de cabra conjugado con R-ficoeritrina (RPE) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). La selección inmune de las células ΔLNGFR⁺ se obtuvo por clasificación magnética de las células utilizando microcuentas MiniMACS (Miltenyi Biotec Inc., Sunnyvale, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de las células ΔLNGFR⁺ era mayor que 92% por tinción con FACS. Las células T primarias se transdujeron por un protocolo de espinoculación modificado (concentración de polibreno: 4 μg/ml; el sobrenadante viral se reemplazó con medio nuevo después de incubación durante una noche). Los linfocitos T ΔLNGFR se seleccionaron 3 días después de la espinoculación como se describe para las líneas de células.

Análisis de transferencia Western

45 Se prepararon extractos proteínicos de células enteras (40 μg) como se ha descrito previamente (Bovolenta et al., 2002), se fraccionaron por tamaños mediante SDS-PAGE al 12,5%, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham, Little Chalfont, UK) por electrotransferencia. Las membranas se bloquearon en leche en polvo con bajo contenido de grasa al 5% durante una hora a temperatura ambiente, y se incubaron luego durante una noche a 4°C con el Ab primario apropiado. Se obtuvo antisuero de conejo HIV-1_{HXB2}*Vif* (Goncalves et al., 1994) de Dana Gabuzda del AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, Bethesda, MD), y se utilizó a dilución 1:1000. Se utilizó el Ab policlonal de conejo contra actina humana (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO) a dilución 1:250. Se utilizó un suero obtenido de un paciente de SIDA, que reconocía todas las proteínas principales del HIV-1, a dilución 1:2000. La fijación del Ab se visualizó por medio de un Ab secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante, Abs anti-conejo y anti-humanos a una dilución 1:10000 (Amersham, Little Chalfont, UK) por un sistema de quimioluminiscencia mejorado (ECL, Amersham).

55 Análisis de transferencia Northern

Células CEM A3.01 se dejaron sin tratar o se trataron con cicloheximida (10 µg/ml; Calbiochem®) durante 8 horas. El RNA total se extrajo por medio del reactivo Trizol (Life Technologies™ Inc., Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se corrieron en geles agarosa-formaldehído al 0,8%, se transfirieron a membrana Hybond-N (Hybond-N, Amersham) por transferencia capilar, se sondaron con 10⁶ dpm/ml de un fragmento ΔLNGFR de 1 kb marcado con ³²P en tampón de hibridación PerfectHyb PLUS (Sigma Chemical Corp., S. Louis, MO) y se expusieron a films de rayos X a -70°C (Fig. 14).

Infección de HIV-1

Las células se sometieron a infección aguda con las cepas de HIV-1 siguientes: el HIV-1 X4 IIB/LAI adaptado en laboratorio (ABI, Advanced Biotechnologies, Columbia, MD), los clones moleculares X4 FHIV-1_{NL4-3} y su derivado Δvif (Gibbs, 1994), los clones moleculares R5 HIV-1 AD8 (ABI, Advanced Biotechnologies, Columbia, MD) y el pAD1vif1 HIV donado amablemente por K. Peden (FDA, NIH, Bethesda, MD). Los virus (MOI comprendida entre 0,01 y 1) se adsorbieron en las células durante 2-5 horas a 37°C y se lavaron luego dos veces con PBS. Las células se resuspendieron finalmente en medio completo y se sembraron a 0,5-1 x 10⁶/ml por triplicado en placas de 96 pocillos. Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon cada 4 días y se guardaron a -80°C hasta que fueron testados por el ensayo de actividad RT dependiente de Mg²⁺ o p24 ELISA siguiendo procedimientos estándar.

Ejemplo 2 - Expresión de Vif mutante dependiente de Tat

Se ha demostrado que las proteínas quiméricas se expresan de una manera dependiente de Tat en células 293T cotransfectadas con los vectores lentivirales que codifican los mutantes Vif y el constructo de empaquetamiento (como fuente de Tat) (Fig. 7).

Se prepararon extractos de células enteras (WCE) como se ha descrito previamente (Bovolenta, 2002 #205). Las proteínas se fraccionaron por tamaños mediante SDS-PAGE, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham, Little Chalfont, UK) por electrotransferencia. Las membranas se bloquearon en leche en polvo con bajo contenido de grasa al 5%, y se incubaron con el Ab primario apropiado. El antisuero de conejo Vif HIV-1_{HXB2} (Goncalves, 1994 #241) se obtuvo de Dana Gabuzda del AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH, Bethesda, MD), y se utilizó a dilución 1:1000.

Las proteínas tienen estabilidad intracelular diferente, en el sentido de que F12-Vif (Fig. 2), Chim2 (Fig. 4A, B) y Chim3 (Fig. 5A, B) ya no están presentes, mientras que WT-Vif (Fig. 1C) y Chim1 (Fig. 3A, B) se acumulan todavía a las 72 horas (Fig. 7).

Ejemplo 3 - Los constructos mutantes Vif inhiben la replicación de HIV-1 en las células T

Se comparó inicialmente la actividad anti-viral potencial de las tres quimeras con la de F12-Vif por infección de células CEM A3.01 transducidas falsamente y transducidas con LV con el clon molecular X4 NL4-3 a la MOI de 0,1. Fig. 8A muestra que Chim1, que comprende la región N-terminal de F12-Vif, no tiene actividad antiviral alguna, mientras que tanto Chim2 como Chim3 (que expresan los dominios C-terminales de F12-Vif) inhiben la replicación de HIV-1 de una manera comparable a la de F12-Vif. Aunque la secuencia de F12-Vif es más corta en Chim3 que en Chim2 (45 aa frente a 104 aa que comprenden 6 frente a 9 sustituciones de aa únicas, respectivamente) su actividad antiviral es ligeramente mayor que la de Chim2. Por esta razón, de aquí en adelante se consigna solamente el efecto de Chim3 en comparación con el de F12-Vif, omitiendo por simplicidad la de Chim2 que es siempre paralela a la de Chim3. Se comprobó la actividad inhibidora de HIV de Chim3 en las células permisivas CEMs (Fig. 8B) y Sup-T1 (Fig. 8C) por infección de las mismas con X4 NL4-3 HIV-1 a la MOI de 0,1. En ambos casos, Chim3 inhibe la replicación de HIV-1 tan eficientemente como F12-Vif. Finalmente, para testar la actividad inhibidora de Chim3 contra una cepa R5 HIV-1, se utilizaron las células PM1 como la única línea de células que puede infectarse con una cepa R5 HIV-1 (Lusso et al., 1995). Las células transducidas falsamente y las transducidas con Chim3PAN se enfrentaron al clon molecular HIV-1 AD8 con MOI de 0,1, y se analizaron respecto a producción viral 6 días después de la infección. Como se muestra en Fig. 8D, las células que expresaban Chim3 exhiben una liberación viral cuatro veces menor que las células falsamente transducidas.

Ejemplo 4 - Chim3 inhibe la replicación de las cepas X4 y R5 HIV-1 en linfocitos T CD4+ derivados de sangre del cordón umbilical

Linfocitos T CD4+ preactivados derivados de sangre del cordón umbilical de donantes normales sanos se transdujeron con los diferentes LVs, y se infectaron con la cepa X4 HIV-1 NL4-3 a la MOI de 0,1. En contraste con las células falsamente transducidas, los linfocitos T que llevaban el gen Chim3 integrado controlan la infección de HIV-1 a todo lo largo del experimento al igual que F12-Vif (Fig. 9A). Se obtuvieron resultados similares con linfocitos T CD4+ derivados de un donante diferente e infectados con el clon molecular R5 de HIV-1 AD8 a la MOI de 0,1 (Fig. 9B).

Ejemplo 5 - Chim3 no restablece la replicación de Δvif HIV-1 en linfocitos T CD4+ derivados de CB

Para investigar si la actividad inhibidora de F12-Vif, Chim2 y Chim3 era dependiente de la presencia de WT-Vif, se infectaron las células no permisivas CEM A3.01 transducidas falsamente y transducidas con vector con Δvif HIV-1 a la MOI de 0,1 (Fig. 10). Como era de esperar, Δvif HIV-1 no se replica en las células transducidas falsamente y transducidas con p ΔN , aunque se desarrolla eficientemente en las células en las cuales WT-Vif está suministrado en *trans*. Es notable que Δvif HIV-1 se libera también de las células que expresan F12-Vif y Chim2, pero no de las que expresan Chim3, lo que indica que el Vif Chim3 es más seguro que el Chim2 en el caso de que encuentre cuasiespecies Δvif HIV-1 alojadas silenciosamente en un paciente (Fig. 10).

En un experimento ulterior, se infectaron linfocitos T CD4+ transducidos falsamente, células transducidas con F12-Vif y con Chim3 con virus *vif*-deficiente generado en el contexto de tropismo de X4 o R5 a la MOI de 0,1 y se siguió la cinética de la infección durante 39 días (X4 Δvif HIV, Fig. 11A) y 29 días (R5 Δvif HIV, Fig. 11B), respectivamente. En contraste con lo que se ha descrito anteriormente (22) y se confirma aquí acerca de F12-Vif, Chim3 no restablece la replicación de ambos virus *vif*-deficientes, aunque se observa un nivel débil de replicación viral con la cepa trópica R5 (Fig. 11B). En su conjunto, estos resultados sugieren que Chim3 no sólo inhibe la replicación de HIV a un nivel similar al alcanzado por F12-Vif, sino que, lo que es más importante, no restablece la replicación de virus *vif*-deficientes. Esto hace por tanto que Chim3 sea un candidato mejor para un enfoque de terapia génica anti-HIV comparado a F12-Vif. Chim3 exhibe de hecho un fenotipo negativo realmente dominante en relación con el efecto de Vif como factor contrapuesto al factor de restricción de HIV-1 hHA3G.

Ejemplo 6 - Chim3 confiere ventaja de supervivencia a las células infectadas por HIV-1 transducidas comparadas con las células falsamente transducidas

Para investigar si las células transducidas con Chim3 podrían exhibir una ventaja selectiva comparadas con sus contrapartidas transducidas falsamente, se mezclaron células CEM A3.01 transducidas con LVs con células transducidas falsamente en iguales proporciones (50:50). Las células se dividieron luego en dos poblaciones, una de las cuales se dejó sin infectar en tanto que la otra se infectó con X4 HIV-1 NL4-3 a la MOI de 0,01. El porcentaje de aumento de las células infectadas con NGFR+ sobre las no infectadas se calculó el día 20 del cultivo. La expresión de NGFR se monitorizó por análisis FACS. Fig. 12 muestra que en todos los tipos de células existe un incremento de células NGFR+ después de la infección con HIV-1. Sin embargo, la mejora de las células transducidas con Chim3 y transducidas con F12-Vif es de 2 a 5 veces mayor comparada con las células de control, lo que indica que ambos genes terapéuticos confieren una ventaja selectiva más acusada en las células modificadas genéticamente.

Ejemplo 7 - Chim3 se degrada preferentemente sólo en el proteasoma en células no permisivas, y su nivel está correlacionado inversamente con el del factor celular humano APOBEC3G (hA3G)

Basándose en el hecho de que Chim3, en contraste con F12-Vif, se comporta como un factor negativo realmente dominante, los inventores se preguntaron cuál sería el nivel de hA3G en las células transducidas con Chim3. Se analizó inicialmente el nivel basal de expresión de la quimera en células no permisivas CEM A3.01 y células permisivas Sup-T1 transducidas no infectadas. Llamativamente, la expresión de Chim2 y Chim3 es mucho menor que la de los otros Vifs (Fig. 13A), lo que sugiere una estabilidad o expresión diferente de las dos quimeras.

Dado que Vif es degradado en las células HeLa y 293T no permisivas por los proteasomas (Fujita et al., 2004) se investigó a continuación el nivel de proteínas Vif en células permisivas y no permisivas en presencia o ausencia del inhibidor de proteasomas MG132. Como se muestra en el panel superior de Fig. 13B, la expresión tanto de Chim2 como de Chim3 es menor que la de los otros Vifs también en las células Sup-T1 y el tratamiento con MG132 induce solamente una pequeña acumulación de las proteínas (Fig. 13C). En contraste, Chim3 se acumula después del tratamiento con MG132 aproximadamente 3 veces más que los otros Vifs (Fig. 13B, panel inferior y 13C). Y lo que es más importante, hA3G es detectable en el análisis de transferencia Western sólo en las células que expresan Chim3 y su nivel está correlacionado inversamente con el de Chim3 en las células tratadas con MG132 (Fig. 13B, panel central). Estos resultados indican que Chim3 se degrada preferentemente en el proteasoma sólo en células no permisivas y su bajo nivel permite la expresión normal de hA2G.

Ejemplo 8 - Chim3 es expresado normalmente por el vector y su mRNA se acumula después de tratamiento con cicloheximida

Par determinar si la baja expresión de Chim3 depende también de la transcripción baja, se realizó un análisis de transferencia Northern del RNA total obtenido a partir de células CEM A3.01 transducidas con LV y no infectadas utilizando la sonda NGFR. Los LVs transcriben tres especies de RNA diferentes, el RNA de longitud total y los RNAs remodelados que están dirigidos por la 5' LTR del vector, y el PGK- Δ LNGFR mRNA constitutivo (Valenti et al., 2005). En las células no infectadas, que carecen de Tat y Rev, la 5' LTR funciona realmente - las proteínas Vif se acumulan - pero más débilmente que en las células infectadas. Por tanto, las dos únicas bandas detectadas corresponden al RNA remodelado que contiene Vif y el Δ LNGFR constitutivo. Sorprendentemente, la expresión de LVs de Chim2 y Chim3 es más fuerte que los otros LVs (Fig. 14A) y está correlacionada inversamente con el nivel de proteína sintetizado. Para investigar ulteriormente la razón de esta aparente discrepancia, se trataron las células durante 8 h con cicloheximida, que bloquea la síntesis de las proteínas. Merece destacarse que la acumulación de mRNA de Chim3 es mayor que la de los otros Vifs (Fig. 14B y C). Estos resultados sugieren que los Vifs analizados, pero no Chim3, regulan su propia transcripción por un mecanismo de retroalimentación negativo. Chim3 se

transcribe de modo normal y su mRNA se transcribe deficientemente, debido probablemente a que la proteína es fácilmente degradada por el proteasoma.

Ejemplo 9 - Inmunogenicidad

- 5 En sí misma, Vif es una de las menos inmunógenas entre las proteínas de HIV-1 (Addo et al., 2003). Es de esperar que los polipéptidos Vif mutantes de la presente invención no difieran significativamente de WT-Vif a este respecto, al menos sobre la base de los dos algoritmos BIMAS (<http://bimas.cit.nih.gov/>) y RANKPEP (<http://www.mifoundation.org/Tools/rankpep.html>) para predicción de péptidos de fijación a HLA-I (datos no presentados). La baja inmunogenicidad y la expresión dependiente de Tat de Vif mutante debería evitar o al menos minimizar una respuesta inmunitaria contra las células no infectadas transducidas por retrovirus in vivo. Por otra parte, la LTR de HIV-1 de tipo salvaje garantiza niveles de expresión muy altos del transgén en las células infectadas con HIV-1, un requerimiento crucial para la actividad de una proteína mutante trans-dominante.
- 10

REIVINDICACIONES

- 1.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica Vif caracterizada porque en la misma cada uno de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 127, 128, 130, 131, 132 y 142 de la secuencia en la Figura 1A son N, V, R, L, S e I respectivamente y en donde la totalidad de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 22, 29, 41, 66, 80, 109, 185 y 186 no son I, I, K, V, N, R, R y N respectivamente.
- 5 2.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica Vif de acuerdo con la reivindicación 1 que se caracteriza porque en el mismo la totalidad de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 22, 29, 41, 48, 66, 80, 109, 185 y 186 no son I, I, K, N, V, N, R, R y N respectivamente.
- 3.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica Vif de acuerdo con la reivindicación 1 que se caracteriza porque en el mismo el aminoácido correspondiente a la posición 48 es N.
- 10 4.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica Vif de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que se caracteriza porque en el mismo los aminoácidos correspondientes a las posiciones 22, 29, 41, 48, 66, 80, 109, 185 y 186 son los presentes en un Vif existente naturalmente, y en donde dichos aminoácidos no son I, I, K, V, N, R, R, y N respectivamente.
- 15 5.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica Vif de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que se caracteriza porque en el mismo el aminoácido correspondiente a la posición 22 es K, 29 es M, 41 es R, 48 es N o H, 66 es I, 80 es H, 109 es L, 185 es G y 186 es S.
- 6.- Un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico Vif que comprende los aminoácidos 126 a 170 de la secuencia F12-Vif en la Figura 2 incrustado en una secuencia Vif existente naturalmente, que se caracteriza porque en el mismo la secuencia Vif existente naturalmente no es F12-Vif.
- 20 7.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 que se caracteriza por comprender una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 5A.
- 8.- Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por comprender una secuencia de nucleótidos que se muestra en la Figura 15.
- 25 9.- Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento del Vif como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que se caracteriza porque en el mismo dicho fragmento comprende al menos los aminoácidos correspondientes a 126 a 170 de la secuencia de la Figura 2.
- 10.- Un polipéptido de Vif codificado por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un fragmento de Vif codificado por el polinucleótido de la reivindicación 9.
- 30 11.- Un polipéptido de Vif que se caracteriza por comprender la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 5A.
- 12.- Un vector que se caracteriza por comprender un polinucleótido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 13.- Un vector de acuerdo con la reivindicación 12 que se caracteriza porque en el mismo el vector es un vector retroviral o lentiviral.
- 14.- Un vector de acuerdo con la reivindicación 13 que se caracteriza porque en el mismo el vector lentiviral puede derivarse de HIV.
- 40 15.- Un vector de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14 que se caracteriza porque en el mismo dicho polinucleótido está enlazado operativamente a una LTR viral.
- 16.- Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que se caracteriza porque en el mismo la expresión de dicho polinucleótido es dependiente de *tat*.
- 17.- Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 que carece del gen *tat*.
- 45 18.- Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 que se caracteriza porque en el mismo la expresión de dicho polipéptido se halla bajo control inducible de HIV-1.
- 19.- Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18 que carece de uno cualquiera o más, o la totalidad, de los genes *gag*, *pol* y *env*.
- 20.- Un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, que se caracteriza por comprender adicionalmente una secuencia de polinucleótidos que codifica un gen marcador seleccionable.

Figura 1A. Secuencia de Consenso WT-Vif

Met Glu Asn Arg Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met
 1 5 10 15

Arg Ile Arg Thr Trp Lys Ser Leu Val Lys His His Met Tyr Val Ser
 20 25 30

Gly Lys Ala Arg Gly Trp Phe Tyr Arg His His Tyr Glu Ser Pro His
 35 40 45

Pro Arg Ile Ser Ser Glu Val His Ile Pro Leu Gly Asp Ala Arg Leu
 50 55 60

Val Ile Thr Thr Tyr Trp Gly Leu His Thr Gly Glu Arg Asp Trp His
 65 70 75 80

Leu Gly Gln Gly Val Ser Ile Glu Trp Arg Lys Lys Arg Tyr Ser Thr
 85 90 95

Gln Val Asp Pro Glu Leu Ala Asp Gln Leu Ile His Leu His Tyr Phe
 100 105 110

Asp Cys Phe Ser Glu Ser Ala Ile Arg Lys Ala Leu Leu Gly His Ile
 115 120 125

Val Ser Pro Arg Cys Glu Tyr Gln Ala Gly His Asn Lys Val Gly Ser
 130 135 140

Leu Gln Tyr Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ile Thr Pro Lys Lys Ile Lys
 145 150 155 160

Pro Pro Leu Pro Ser Val Thr Lys Leu Thr Glu Asp Arg Trp Asn Lys
 165 170 175

Pro Gln Lys Thr Lys Gly His Arg Gly Ser His Thr Met Asn Gly His
 180 185 190

Figura 1B. Alineaciones de la secuencia de consenso

	5	15	25	35	45	55
HXB2	MENRWQVMIV	WQVDRMRIRT	WKSLVKHHMY	VSGKARGWFY	RHHYESPHPR	ISSEVHIPLG
BRU	MENRWQVMIV	WQVDRMRIRT	WKSLVKHHMY	VSGKARGWFY	RHHYESPHPR	ISSEVHIPLG
SF2	MENRWQVMIV	WQVDRMRIRT	WKSLVKHHMY	ISKKAKGWFY	RHHYESTHPR	VSSEVHIPLG
PV22	MENRWQVMIV	WQVDRMRIRT	WKSLVKHHMY	VSGKARGWFY	RHHYESPHPR	ISSEVHIPLG
MN	MENRRQVMIV	WQADRMRIIT	WKSLVKHHMY	ISKKAKGRFY	RHHYESTHPR	ISSEVHIPLG
F12Vif	MENRWQVMIV	WQVDRMRIRT	WISLVKHHIY	ISKKAKGWFY	KHHYESTNPR	ISSEVHIPLG
Consenso	MENRWQVMIV	WQVDRMRIRT	WKSLVKHHMY	VSGKARGWFY	RHHYESPHPR	ISSEVHIPLG

	65	75	85	95	105	115
HXB2	DARLVITTYW	GLHTGERDWH	LGQGVSIWR	KKRYSTQVDP	ELADQLIHLY	YFDCFSDSA
BRU	DARLVITTYW	GLHTGERDWH	LGQGVSIWR	KKRYSTQVDP	ELADQLIHLY	YFDCFSDSA
SF2	DAKLIVITTYW	GLHTGEREWH	LGQGVVLEWR	KKRYSTQVDP	GLADQLIHLH	YFDCFSESA
PV22	DARLVITTYW	GLHTGERDWH	LGQGVSIWR	KKRYSTQVDP	ELADQLIHLY	YFDCFSDSA
MN	DARLVITTYW	GLHTGERDWH	LGQGVSIWR	KKRYSTQVDP	DLADHLIHLH	YFDCFSDSA
F12Vif	DARLVITTYW	GLHTGERDWN	LGQGVSIWR	KKRYSTQVDP	GLADQLIHRY	YFDCFSESA
Consenso	DARLVITTYW	GLHTGERDWH	LGQGVSIWR	KKRYSTQVDP	ELADQLIHLY	YFDCFSDSA

	125	135	145	155	165	175
HXB2	RKALLGHIVS	PRCEYQAGHN	KVGSLOYLAL	AALITPKKIK	PPLPSVTKLT	EDRWKPKQT
BRU	RKALLGHIVS	PRCEYQAGHN	KVGSLOYLAL	AALITPKKIK	PPLPSVTKLT	EDRWKPKQT
SF2	KNAILGYRVS	PRCEYQAGHN	KVGSLOYLAL	AALITPKKTK	PPLPSVKKLT	EDRWKPKQT
PV22	RKALLGHIVS	PRCEYQAGHN	KVGSLOYLAL	AALITPKKIK	PPLPSVTKLT	EDRWKPKQT
MN	RKAILGHRVS	PICEFQAGHN	KVGPLQYLAL	TALITPKKIK	PPLPSVKKLT	EDRWKPKQT
F12Vif	RNAILGNVVR	LSCEYQAGHN	KIGSLOYLAL	AALITPKKIK	PPLPSVTKLT	EDRWKPKQT
Consenso	RKALLGHIVS	PRCEYQAGHN	KVGSLOYLAL	AALITPKKIK	PPLPSVTKLT	EDRWKPKQT
					
	185					
HXB2	KGHRGSHTMN	GH				
BRU	KGHRGSHTMN	GH				
SF2	KGHRGSHTMN	GH				
PV22	KGHRGSHTMN	GH				
MN	KGHRGSHTIN	GH				
F12Vif	KGHRRNHTMN	GH				
Consenso	KGHRGSHTMN	GH				

Figura 1C. Secuencia NL4-3 Vif

MENRWQVMIVWQVDRMRINTWKRLVKHHMYISRKAKDWFYRHHYESTNPKISSEVHIPLGDAKLIVITTYWGLHTGERDWH
 LGQGVSIWRKKRYSTQVDPDLADQLIHLHYFDCFSESAIRNTILGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLOYLALAAALIKPKQIK
 PPLPSVRKLTEDRWKPKQKTKGHRGSHTMNGH

Figura 2. F12-Vif

Met Glu Asn Arg Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met
 1 5 10 15

Arg Ile Arg Thr Trp Ile Ser Leu Val Lys His His Ile Tyr Ile Ser
 20 25 30

Lys Lys Ala Lys Gly Trp Phe Tyr Lys His His Tyr Glu Ser Thr Asn
 35 40 45

Pro Arg Ile Ser Ser Glu Val His Ile Pro Leu Gly Asp Ala Arg Leu
 50 55 60

Val Val Thr Thr Tyr Trp Gly Leu His Thr Gly Glu Arg Asp Trp Asn
 65 70 75 80

Leu Gly Gln Gly Val Ser Ile Glu Trp Arg Lys Lys Arg Tyr Ser Thr
 85 90 95

Gln Val Asp Pro Gly Leu Ala Asp Gln Leu Ile His Arg Tyr Tyr Phe
 100 105 110

Asp Cys Phe Ser Glu Ser Ala Ile Arg Asn Ala Ile Leu Gly Asn Val
 115 120 125

Val Arg Leu Ser Cys Glu Tyr Gln Ala Gly His Asn Lys Ile Gly Ser
 130 135 140

Leu Gln Tyr Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ile Thr Pro Lys Lys Ile Lys
 145 150 155 160

Pro Pro Leu Pro Ser Val Thr Lys Leu Thr Glu Asp Arg Trp Asn Lys
 165 170 175

Pro Gln Lys Thr Lys Gly His Arg Arg Asn His Thr Met Asn Gly His
 180 185 190

Figura 3A. Chim1

Met Glu Asn Arg Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met
 1 5 10 15
 Arg Ile Arg Thr Trp Ile Ser Leu Val Lys His His Ile Tyr Ile Ser
 20 25 30
 Lys Lys Ala Lys Gly Trp Phe Tyr Lys His His Tyr Glu Ser Thr Asn
 35 40 45
 Pro Arg Ile Ser Ser Glu Val His Ile Pro Leu Gly Asp Ala Arg Leu
 50 55 60
 Val Val Thr Thr Tyr Trp Gly Leu His Thr Gly Glu Arg Asp Trp Asn
 65 70 75 80
 Leu Gly Gln Gly Val Ser Ile Glu Trp Arg Lys Lys Arg Tyr Ser Thr
 85 90 95
 Gln Val Asp Pro Asp Leu Ala Asp Gln Leu Ile His Leu His Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Cys Phe Ser Glu Ser Ala Ile Arg Asn Thr Ile Leu Gly Arg Ile
 115 120 125
 Val Ser Pro Arg Cys Glu Tyr Gln Ala Gly His Asn Lys Val Gly Ser
 130 135 140
 Leu Gln Tyr Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ile Lys Pro Lys Gln Ile Lys
 145 150 155 160
 Pro Pro Leu Pro Ser Val Arg Lys Leu Thr Glu Asp Arg Trp Asn Lys
 165 170 175
 Pro Gln Lys Thr Lys Gly His Arg Gly Ser His Thr Met Asn Gly His
 180 185 190

Figura 3B. Chim1

*MENRWQVMIVWQVDRMRIRTWISLVKHHIYISKKAKGWFYKHHYESTNPRISSEVHIPLGDAR
 LVVTTYWGLHTGERDWNLGQGVSEWRKKRYSTQVDPDLADQLIHLHYFDCFSESAIRNTI
 LGRIVSPRCEYQAGHNKVGSLQYLALAAALIKPKQIKPPLPSVRKLTEDRWNKPKQKTKGHR
 GSHTMNGH*

Figura 4A. Chim2

Met Glu Asn Arg Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met
 1 5 10 15
 Arg Ile Asn Thr Trp Lys Arg Leu Val Lys His His Met Tyr Ile Ser
 20 25 30
 Arg Lys Ala Lys Asp Trp Phe Tyr Arg His His Tyr Glu Ser Thr Asn
 35 40 45
 Pro Lys Ile Ser Ser Glu Val His Ile Pro Leu Gly Asp Ala Lys Leu
 50 55 60
 Val Ile Thr Thr Tyr Trp Gly Leu His Thr Gly Glu Arg Asp Trp His
 65 70 75 80
 Leu Gly Gln Gly Val Ser Ile Glu Trp Arg Lys Lys Arg Tyr Ser Thr
 85 90 95
 Gln Val Asp Pro Gly Leu Ala Asp Gln Leu Ile His Arg Tyr Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Cys Phe Ser Glu Ser Ala Ile Arg Asn Ala Ile Leu Gly Asn Val
 115 120 125
 Val Arg Leu Ser Cys Glu Tyr Gln Ala Gly His Asn Lys Ile Gly Ser
 130 135 140
 Leu Gln Tyr Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ile Thr Pro Lys Lys Ile Lys
 145 150 155 160
 Pro Pro Leu Pro Ser Val Thr Lys Leu Thr Glu Asp Arg Trp Asn Lys
 165 170 175
 Pro Gln Lys Thr Lys Gly His Arg Arg Asn His Thr Met Asn Gly His
 180 185 190

Figura 4B. Chim2

MENRWQVMIVWQVDRMRINTWKRLVKHHMYISRKAKDWFYRHHYESTNPKISSEVHIP
 LGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSIIEWRKKRYSTQVDPGLADQLIHRYYFDCFSESAI
 RNAILGNVVRLSCEYQAGHNKIGSLQYLALAAALITPKKIKPPLPSVTKLTEDRWKPKQKTKGHR
 NHTMNGH

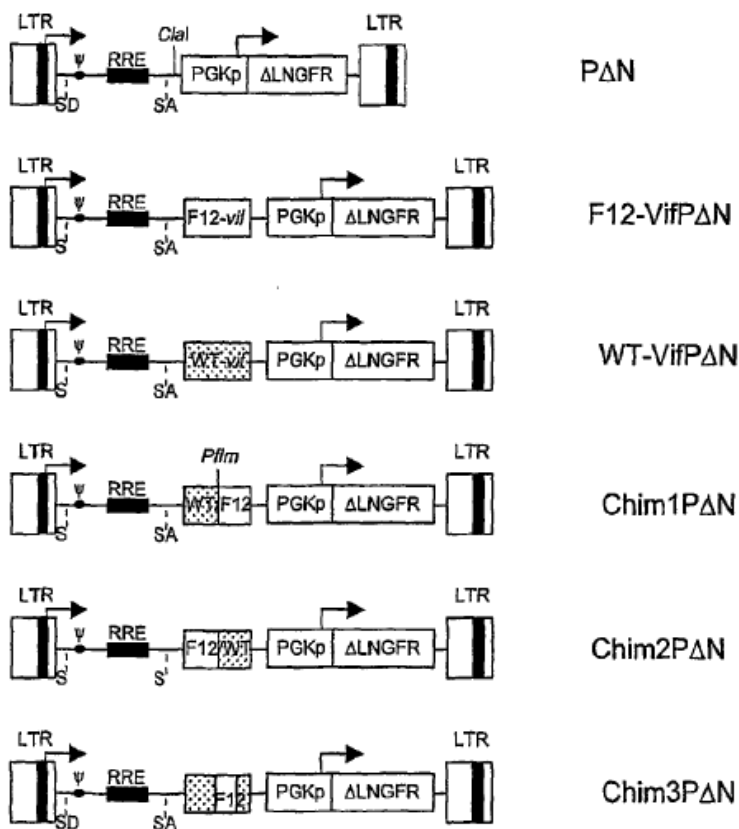
Figura 5A. Chim3

Met Glu Asn Arg Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met
 1 5 10 15
 Arg Ile Asn Thr Trp Lys Arg Leu Val Lys His His Met Tyr Ile Ser
 20 25 30
 Arg Lys Ala Lys Asp Trp Phe Tyr Arg His His Tyr Glu Ser Thr Asn
 35 40 45
 Pro Lys Ile Ser Ser Glu Val His Ile Pro Leu Gly Asp Ala Lys Leu
 50 55 60
 Val Ile Thr Thr Tyr Trp Gly Leu His Thr Gly Glu Arg Asp Trp His
 65 70 75 80
 Leu Gly Gln Gly Val Ser Ile Glu Trp Arg Lys Lys Arg Tyr Ser Thr
 85 90 95
 Gln Val Asp Pro Asp Leu Ala Asp Gln Leu Ile His Leu His Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Cys Phe Ser Glu Ser Ala Ile Arg Asn Thr Ile Leu Gly Asn Val
 115 120 125
 Val Arg Leu Ser Cys Glu Tyr Gln Ala Gly His Asn Lys Ile Gly Ser
 130 135 140
 Leu Gln Tyr Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ile Thr Pro Lys Lys Ile Lys
 145 150 155 160
 Pro Pro Leu Pro Ser Val Thr Lys Leu Thr Glu Asp Arg Trp Asn Lys
 165 170 175
 Pro Gln Lys Thr Lys Gly His Arg Gly Ser His Thr Met Asn Gly His
 180 185 190

Figura 5B. Chim3

MENRWQVMIVWQVDRMRINTWKRLVKHHMYISRKAKDWFYRHHYESTNPKISSEVHI
 PLGDAKLVITTYWGLHTGERDWHLGQGVSIEWRKKRYSTQVDPDLADQLIHLHYFDCF
 SESAIRNTILGNVVRLSCEYQAGHNKIGSLQYLALALITPKKIKPPLPSVTKLTEDRWNKPKQK
 TKGHRGSHTMNGH

Figura 6. Representación esquemática de los vectores lentivirales PΔN, WT-VifPΔN, F12-VifPΔN, Chim1PΔN, Chim2PΔN, y Chim3PΔN en sus formas provirales.



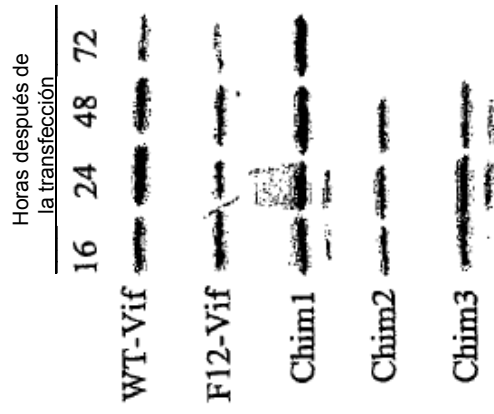


Figura 7

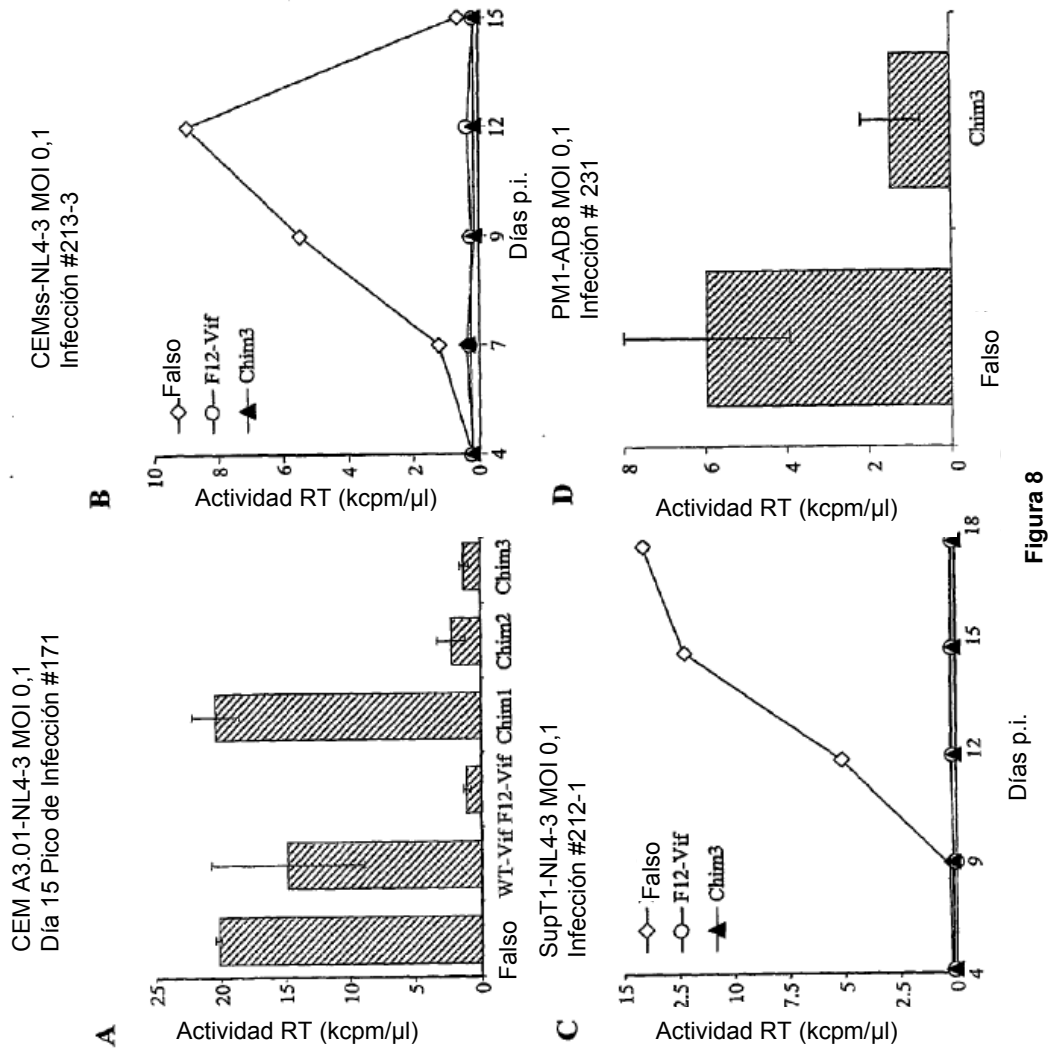


Figura 8

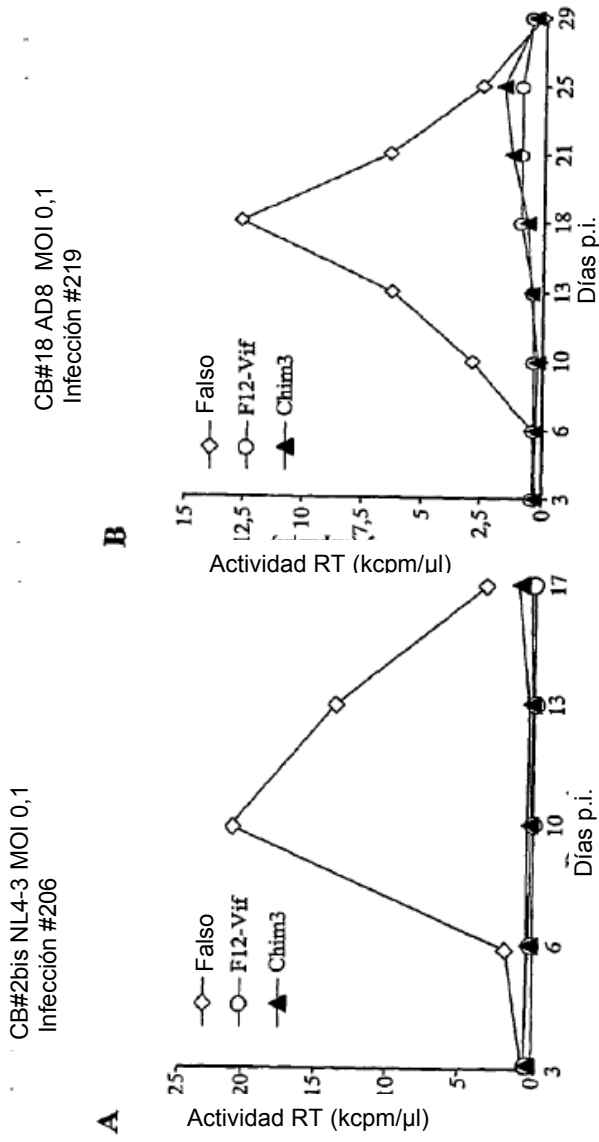


Figura 9

CEM a3.01 NL4-3Δ-vif X4 MOI 0,1
Infección #179

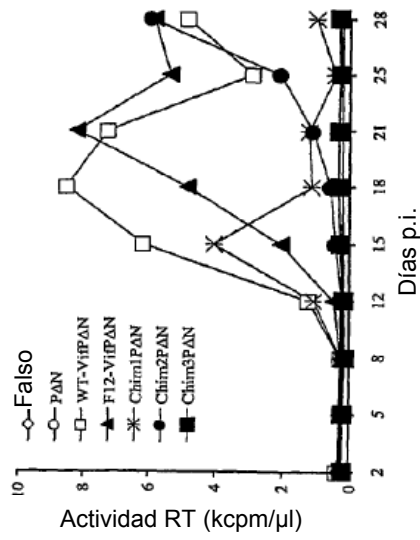


Figura 10

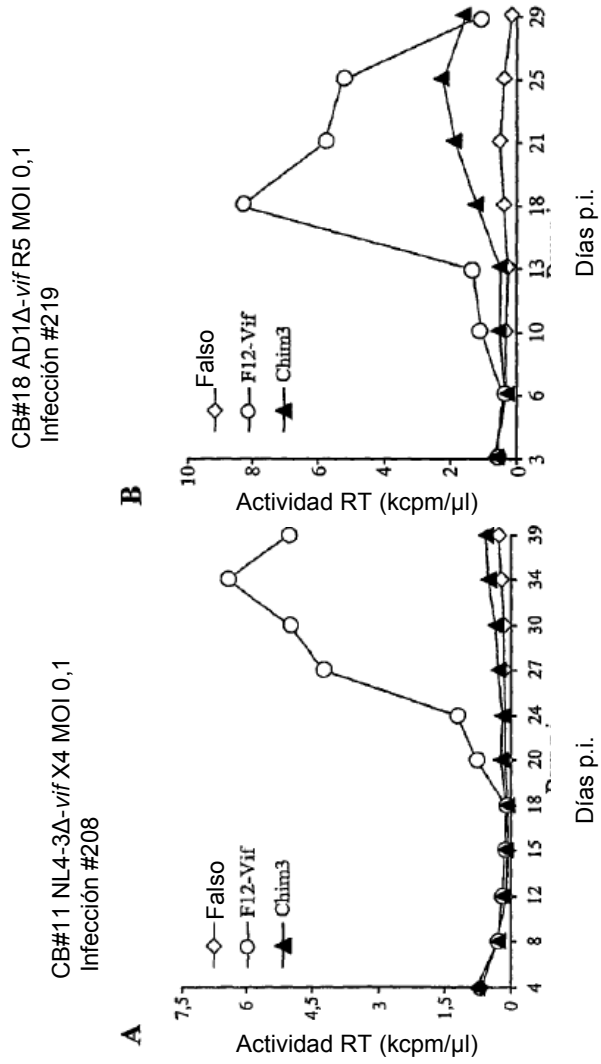


Figura 11

CEM A3.01 NL4-3 OI 0,1
Infección #227 50:50%

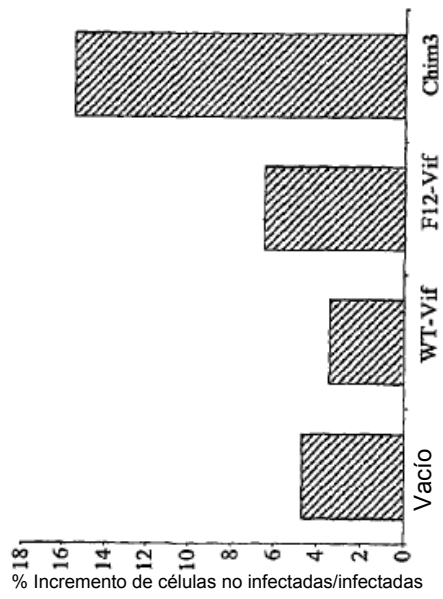


Figura 12

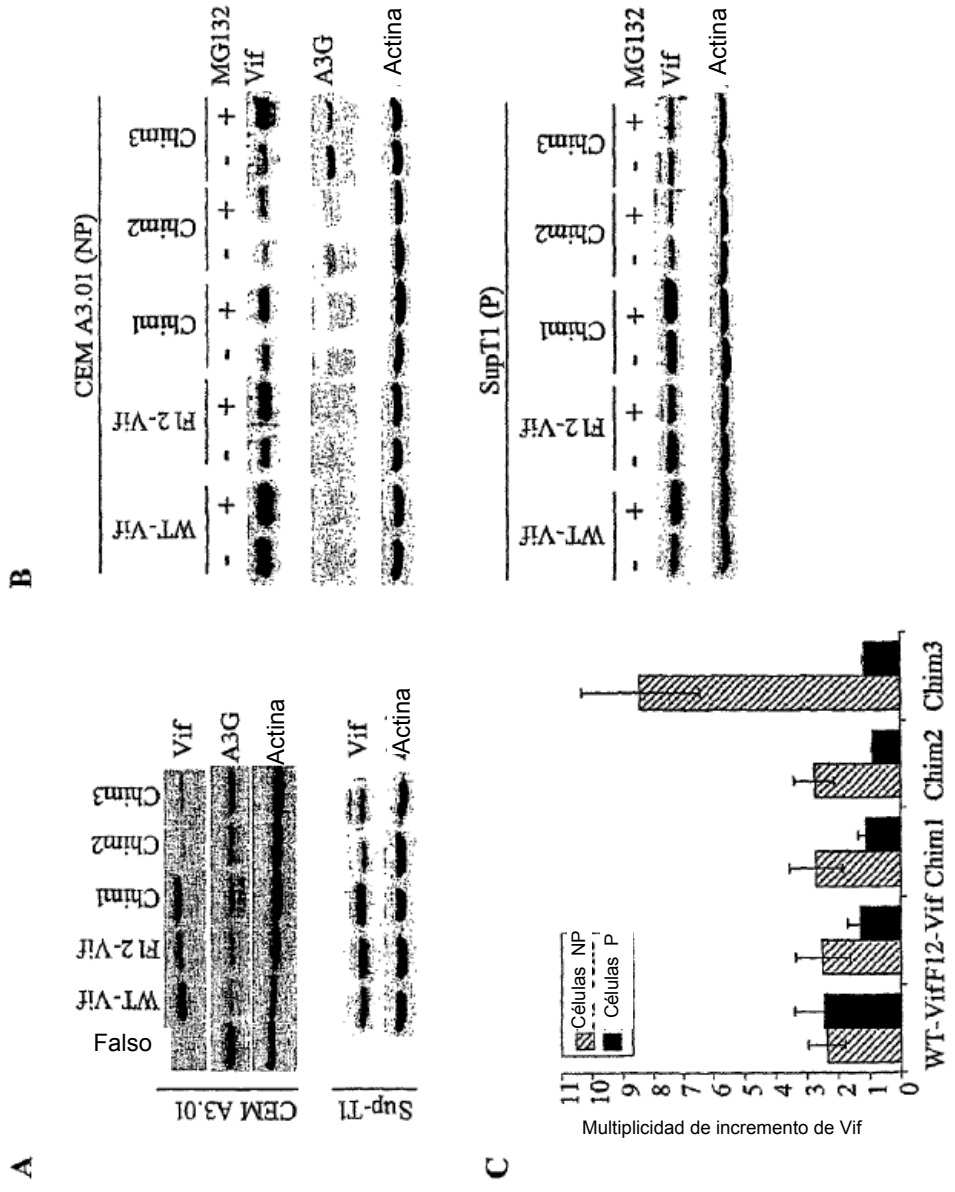


Figura 13

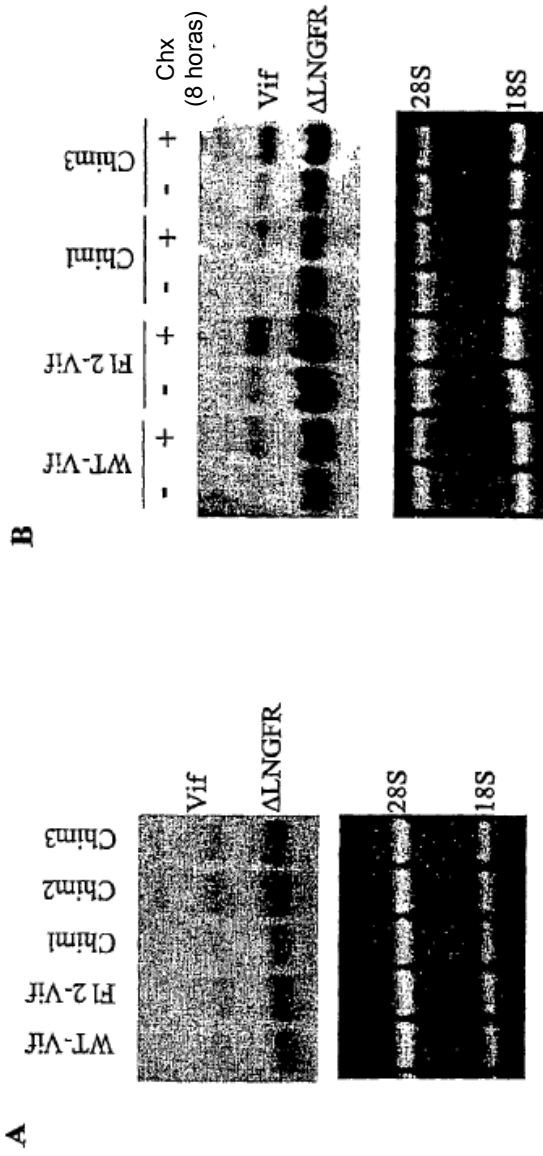


Figura 14

CHIM3

ATCGATGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGA
TGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACACCATATGTATATTTCAAGGAAAGC
TAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAGAA
GTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATA
CAGGAGAAAGAGACTGGCATTGTTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGA
GATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAATTCATCTGCACTATTTT
GATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGAAATGTAGTTAGACTTAG
TTGTGAATATCAAGCAGGACATAACAAGATAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCA
GCATTAATAACACCAAAAAAGATAAAGCCACCTTTGCCTAGTGTTACGAAACTGACAG
AGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGA
ATGGACACTAGCATCGAT

FIGURA 15

Chim2

TATCGATGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAA
GATTAGTAAAACACCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCA
AAAATAAGTTCAGAAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTAAATAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGA
AAGAGACTGGCATTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAAatggaggaaaaagagatatagcacacaagtagaccctggcctag
cagaccaactaatcctcgggtattatTTTTGATTGTTTTcagaatctgctataaagaatgccatactaggaatgtagtt
agacttagttgtgaatatcaagcaggacataacaagataggatctctacaatacttggcactagcagcattaataacacc
aaaaaagataaagccaccttgcctagtgttacgaaactgacagaggatagatggaacaagccccagaagaccaagggcc
acagaaggaaccataacaatgaatggacactagatcgata

ATCGATGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAAAAG
ATTAGTAAAACACCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAA
AAATAAGTTCAGAAGTACACATCCCACTAGGGGATGCTAAATAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAA
AGAGACTGGCATTGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCCCTGGCCTAGC
AGACCAACTAATTCATCGGTATATATTTGATTGTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATGCCATACTAGGAAATGTAGTTA
GACTTAGTTGTGAATATCAAGCAGGACATAACAAGATAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAATAACACCA
AAAAAGATAAAGCCACCTTTGCCTAGTGTACGAAACTGACAGAGGATAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCA
CAGAAGGAACCATACAATGAATGGACACTAGATCGATA

FIGURA 16

ATCGATGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGG
ATGAGGATTAACACATGGAAAAGATTAGTAAAACACCATATGTATATTTCAAGGAAAG
CTAAGGACTGGTTTTATAGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTCAGAA
GTACACATCCCCTAGGGGATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATA
CAGGAGAAAGAGACTGGCATTGGGGTCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGA
GATATAGCACACAAGTAGACCCTGACCTAGCAGACCAACTAATTCATCTGCACTATTT
TGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATAAGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTA
GGTGTGAATATCAAGCAGGACATAACAAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAG
CAGCATTAAATAAAACAAAACAGATAAAGCCACCTTTGCCTAGTGTTAGGAAACTGAC
AGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAA
TGAATGGACACTAGCATCGAT

FIGURA 17 – NL4-3

ATCGATGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGAT
GAGGATTAGAACATGGATAAGTTTAGTAAAACACCATATATATATTTCAAAGAAAGCTAAG
GGATGGTTTTATAAACATCACTATGAAAGCACTAATCCAAGAATAAGTTCAGAAGTACACA
TCCCACTAGGGGATGCTAGATTGGTAGTAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAA
AGAGACTGGAATTTAGGCCAGGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCAC
ACAAGTAGACCCTGGCCTAGCAGACCAACTAATTCATCGGTATTATTTTGATTGTTTTTCA
GAATCTGCTATAAGAAATGCCATACTAGGAAATGTAGTTAGACTTAGTTGTGAATATCAAG
CAGGACATAACAAGATAGGATCTCTACAATACTTGGCACTAGCAGCATTAAACACCAA
AAAAGATAAAGCCACCTTTGCCTAGTGTTACGAAACTGACAGAGGATAGATGGAACAAG
CCCAGAAGACCAAGGGCCACAGAAGGAACCATACAATGAATGGACACTAG

FIGURA 18 F12-Vif

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es para comodidad del lector únicamente. No forma parte del documento de la patente europea. Aun cuando se tuvo gran cuidado al reunir las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes (EPO) declina toda responsabilidad a este respecto.

Literatura no de patentes citada en la descripción

- **J. SAMBROOK ; E. F. FRITSCH ; T. MANIATIS.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, vol. 1-3 [0072]
- **AUSUBEL, F. M. et al.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1995 [0072]
- **B. ROE ; J. CRABTREE ; A. KAHN.** DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques. John Wiley & Sons, 1996 [0072]
- **J. M. POLAK ; JAMES O'D. MCGEE.** Situ Hybridization: Principles and Practice. Oxford University Press, 1990 [0072]
- **Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach.** Irl Press, 1984 [0072]
- **D. M. J. LILLEY ; J. E. DAHLBERG.** Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology. Academic Press, 1992 [0072]
- **ALDROVANDI, G. M. ; ZACK, J. A. J. Virol.,** 1996, vol. 70, 1505-1511 [0076]
- **DESROSIERS, R. C. et al. J. Virol.,** 1998, vol. 72, 1431-1437 [0076]
- **COFFIN et al.** Retroviruses. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997, 758-763 [0109]
- **Remington's Pharmaceutical Sciences.** Mack Publishing Co, 1985 [0139]
- **RICHMAN. Nature,** 2001, vol. 410, 995-1001 [0168]
- **HO et al. Cell,** 2002, vol. 110, 135-138 [0168]
- **BLANKSON et al. Annu. Rev. Med.,** 2002, vol. 53, 557-593 [0168]
- **BUCHSCHACHER et al. Hum. Gene Ther.,** 2001, vol. 12, 1013-1019 [0168]
- **WOFFENDIN et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** 1996, vol. 93, 2889-2894 [0168]
- **RANGA et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** 1998, vol. 95, 1201-1206 [0168]
- **WONG-STAAAL et al. Hum. Gene Ther.,** 1998, vol. 9, 2407-2425 [0168]
- **JACQUE et al. Nature,** 2002, vol. 418, 435-438 [0168]
- **NOVINA et al. Nat. Med.,** 2002, vol. 8, 681-686 [0168]
- **LEE et al. Nat Biotechnol.,** 2002, vol. 20, 500-505 [0168]
- **COBURN et al. J. Virol.,** 2002, vol. 76, 9225-9231 [0168]
- **QIN et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,** 2003, vol. 100, 183-188 [0168]
- **BAUM et al. Blood,** 2003, vol. 101, 2099-2114 [0168]
- **CULLEN et al. Cell,** 1998, vol. 93, 685-692 [0168]
- **FRANKEL et al. Annu. Rev. Biochem.,** 1998, vol. 67, 1-25 [0168]
- **FISHER et al. Science,** 1987, vol. 237, 888-893 [0168]
- **FOUCHIER et al. J. Virol.,** 1996, vol. 70, 8263-8269 [0168]
- **GABUZDA et al. J. Virol.,** 1992, vol. 66, 6489-6495 [0168]
- **SHEEHY et al. J. Virol.,** 1996, vol. 70, 1505-1511 [0168]
- **DESROSIERS et al. J. Virol.,** 1998, vol. 72, 1431-1437 [0168]
- **SIMON et al. J. Virol.,** 1996, vol. 70, 5297-5305 [0168]
- **VON SCHWEDLER et al. J. Virol.,** 1993, vol. 67, 4945-4955 [0168]
- **SOVA et al. J. Virol.,** 1995, vol. 69, 2557-2564 [0168]
- **WIELAND et al. Virology,** 1994, vol. 203, 43-51 [0168]
- **WIELAND et al. J. Gen. Virol.,** 1997, vol. 78, 393-400 [0168]
- **TENG et al. Science,** 1993, vol. 260, 1816-1819 [0168]
- **SOVA et al. J. Virol.,** 2001, vol. 75, 5504-5517 [0168]
- **ZIMMERMAN et al. Nature,** 2002, vol. 415, 88-92 [0168]
- **ZHANG et al. J. Virol.,** 2000, vol. 74, 8252-8261 [0168]
- **DETENHOFER et al. J. Virol.,** 2000, vol. 74, 8938-8945 [0168]
- **LIU et al. J. Virol.,** 1995, vol. 69, 7630-7638 [0168]
- **KAO et al. J. Virol.,** 2003, vol. 77, 1131-1140 [0168]
- **MARIANI et al. Cell,** 2003, vol. 114 (1), 21-31 [0168]
- **VON SCHWEDLER et al. J. Virol.,** 1992, vol. 67, 4945-4955 [0168]
- **BORMAN et al. J. Virol.,** 1995, vol. 69, 2058-2067 [0168]
- **BOUYAC et al. J. Virol.,** 1997, vol. 71, 2473-2477 [0168]
- **HOGLUND et al. Virology,** 1994, vol. 201, 349-355 [0168]
- **FEDERICO et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses,** 1989, vol. 5, 385-396 [0168]
- **D'ALOJA et al. J. Virol.,** 1998, vol. 72 (5), 4308 [0168]
- **TADDEO et al. J. Virol.,** 1996, vol. 70, 8277-8284 [0168]
- **YANG et al. J. Biol. Chem.,** 2001, vol. 276 (7), 4888-4893 [0168]

- **MAVILIO et al.** *Blood*, 1994, vol. 83, 1988-1997 [0168]
- **SUBBRAMANIAN et al.** *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 187, 1103-1111 [0168]
- **VODICKA et al.** *Genes Dev.*, 1998, vol. 12, 175-185 [0168]
- **FOLLENZIET et al.** *Nat. Genet.*, 2000, vol. 25, 217-222 [0168]
- **RE et al.** *Prog. Cell Cycle Res.*, 1997, vol. 3, 21-27 [0168]
- **EMERMAN et al.** *Cell*, 1989, vol. 57, 1155-1165 [0168]
- **MALIM et al.** *Nature*, 1989, vol. 338, 254-257 [0168]
- **GRIGNANI et al.** *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 14-19 [0168]
- **SONEOKA et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1995, vol. 23, 628-633 [0168]
- **FERRARI et al.** *Science*, 1991, vol. 251, 1363 [0168]
- **FOLKS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1985, vol. 82, 4539-4543 [0168]
- **BONINI et al.** *Science*, 1997, vol. 276, 1719-1724 [0168]
- **DULL et al.** *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 8463-8471 [0168]
- **ZUFFEREY et al.** *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 9873-9880 [0168]
- **ZUFFEREY et al.** *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 871-875 [0168]
- **BOVOLENTA et al.** *Blood*, 2002, vol. 99, 224-231 [0168]
- **GONCALVES et al.** *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 704-712 [0168]
- **VICENZI et al.** *J. Virol.*, 1999, vol. 73, 7515-7523 [0168]
- **GIBBS et al.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1994, vol. 10, 343-350 [0168]
- **FOLKS et al.** *Science*, 1987, vol. 238, 800-802 [0168]
- **FOLKES et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1989, vol. 86, 2365-2368 [0168]
- **LECOSSIER et al.** *Science*, 2003, vol. 300, 1112 [0168]
- **HARRIS et al.** *Cell*, 2003, vol. 113, 803-809 [0168]
- **ADDO et al.** *J. Virol.*, 2003, vol. 77, 2081-2092 [0168]
- **NAVARRO et al.** *Curr Opin Immunol*, 2004, vol. 16, 477-82 [0168]
- **TRONO.** *EMBO Rep*, 2004, vol. 5, 679-80 [0168]
- **CLOUSE et al.** *J. Immunol.*, 1989, vol. 142, 431-8 [0168]
- **BONINI et al.** *Nat. Med.*, 2003, vol. 9, 367-9 [0168]
- **LUSSO et al.** *J. Virol.*, 1995, vol. 69, 3712-20 [0168]
- **NARA et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 469-70 [0168]
- **SMITH et al.** *Cancer Res.*, 1984, vol. 44, 4657-60 [0168]
- **SHEEHY et al.** *CANCER RES.*, 2002, vol. 418, 646-50 [0168]
- **FUJITA et al.** *Microbes Infect*, 2004, vol. 6, 791-8 [0168]
- **VALLANTI et al.** *Mol. Ther.*, 2005, vol. 12, 697-706 [0168]