

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 206**

51 Int. Cl.:
C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08706955 .5**
96 Fecha de presentación: **03.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2094855**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Utilización de recombinasas adaptadas para el tratamiento de las infecciones retrovíticas**

30 Prioridad:
08.01.2007 EP 07100206

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.04.2012

73 Titular/es:
**Heinrich-Pette-Institut Leibniz-Institut für
experimentelle Virologie-Stiftung bürgerlichen
Rechts -
Martinistrasse 52
20251 Hamburg, DE;
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V. y
Technische Universität Dresden**

72 Inventor/es:
**HAUBER, Joachim;
BUCHHOLZ, Frank;
HAUBER, Ilona;
STEWART, A. Francis y
SARKAR, Indrani**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

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

ES 2 379 206 T3

DESCRIPCIÓN

Utilización de recombinasas adaptadas para el tratamiento de las infecciones retrovíticas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada (tailored), en la que dicha recombinasa adaptada recombina sitios diana asimétricos dentro de la LTR de ADN provírico de un retrovirus que se inserta en el genoma de una célula hospedadora. Dichas recombinasas adaptadas que reconocen sitios diana asimétricos dentro de la LTR de ADN provírico son medios para escindir el provirus procedente del genoma de la célula hospedadora. La presente invención se refiere más a la
10 utilización de recombinasas adaptadas para la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas a reducir la carga vírica en un paciente infectado por un retrovirus. Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para optimizar *in vitro* el tratamiento de una infección retrovítica de un paciente que comprende adaptar (tailoring) recombinasas que reconocen específicamente y recombinan secuencias de sitios diana asimétricos dentro del ADN provírico de los retrovirus, el paciente está infectado.

15 Antecedentes de la técnica

Las infecciones retrovíticas, como por ejemplo las infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) siguen siendo una de las enfermedades humanas más importantes y más extendidas.

20 Con respecto al SIDA, aproximadamente 39,5 millones de personas viven con el VIH, retrovirus causante del SIDA. Datos recientes muestran que incluso en 2006 existían aproximadamente 4,3 millones de nuevas infecciones en algunas zonas del mundo en las que las tasas de infección han aumentado en más del 50% desde 2004. Además, en 2006, aproximadamente 2,9 millones de personas murieron de enfermedades relacionadas con el SIDA, según el
25 AIDS Epidemic Update 2006, publicado por la OMS (en diciembre de 2006).

Los principales objetivos de la terapia antirretrovítica aplicada son una reducción de la mortalidad y la morbilidad relacionada con el VIH, una mejora de la calidad de vida, un restablecimiento y conservación de las funciones inmunológicas y supresión máxima y duradera de la carga vírica. La terapia antirretrovítica actual, más exactamente,
30 los regímenes de tratamiento contra el VIH se basan principalmente en inhibidores enzimáticos de virus y en moléculas que inhiben la fusión virus-célula.

En este sentido se dispone de cuatro clases de medicamentos anti-VIH que se utilizan en el tratamiento del SIDA. Estas clases de fármacos se dirigen a etapas específicas en el proceso de multiplicación del VIH.

35 Inhibidores de la fusión (IF) son la primera clase de agentes activos, que actúan fuera de las células hospedadoras a fin de impedir que el VIH se fusione con estas células, al introducirse e infectarlas. Existe un planteamiento relacionado para impedir la unión del VIH a la célula diana mediante los receptores CD4 y co-receptores denominados CCR5 o CXCR4 en la superficie de las células diana.

40 Las otras tres clases de agentes activos actúan dentro de la célula. Los denominados inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa (INTI), inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa inversa (INNTI) y los inhibidores de proteasa (IP) se utilizan para impedir la multiplicación del virus dentro de las células hospedadoras una vez se han infectado con el VIH.

45 Son ejemplos de los INTI y INNTI que impiden que el VIH haga una copia de su información genética (produciendo de este modo el denominado ADN provírico) 3TC (lamivudina, Epivir), abacavir (Ziagen), AZT (zidovudina, Retrovir), d4T (estavudina, Zerit), ddC (zalcitabine, Hivid), ddl (didanosina, Videx/VidexEC), FTC (emtricitabine, Emtriva), Efavirenz (Sustiva) y nevirapina (Vi-ramune).

50 Los IP dirigen el VIH enzima proteasa implicado en el montaje del virus. Ejemplos de estos agentes activos son Amprenavir (Agenerase), atazanavir (Reyataz), fosamprenavir (Telzir), indinavir (Crixivan), lopinavir, nelfinavir (Viracept), ritonavir (Norvir) y saquinavir (Invirase y Fortovase).

55 Un tipo de terapia de combinación utilizada actualmente que implica la utilización de más de un agente activo es la Terapia Antirretrovítica Hiperactiva (TARHA) destinado a la transcriptasa inversa vírica, proteasa y fusión (Gulick *et al.*, 1997; Lalezari *et al.*, 2003). La aplicación de esta terapia ha dado como resultado la transformación de la infección por VIH-1 en una enfermedad crónica que ha reducido la morbilidad de los individuos infectados.

60 Un inconveniente, sin embargo, de todas las estrategias actuales del tratamiento es que sólo suprimen el ciclo de vida vírica sin erradicar la infección. El principal obstáculo en estas terapias parece ser la creación de depósitos permanentes del VIH-1, sobre todo en linfocitos T CD4⁺ en reposo infectados en estado latente (Chun *et al.*, 1998; Finzi *et al.*, 1997), que requieren TARHA permanente.

65 Lamentablemente, en un número creciente de pacientes la TARHA permanente está acompañada por efectos secundarios adversos significativos incluyendo la toxicidad mitocondrial, la lipodistrofia, la diabetes mellitus y la

osteoporosis (Dybul *et al.*, 2002). Toxicidades sustanciales de fármacos a menudo producen adherencia inadecuada, dando como resultado la inhibición insuficiente de la multiplicación del virus. Como consecuencia, están surgiendo nuevas cepas del VIH-1 que son resistentes a tratamientos supresores (Little *et al.*, 2002). En vista del creciente número de cepas de VIH resistentes son necesarios y se están desarrollando actualmente nuevos agentes activos. Además, para mejorar el control del VIH-1 se están probando más dianas víricas y nuevas estrategias de inhibición (Donzella, 1998; Chiu *et al.*, 2005; Hazuda *et al.*, 2004; Hauber *et al.*, 2005).

Un planteamiento alternativo en esta materia consiste en dirigir el provirus insertado en el genoma de la célula hospedadora. La escisión del ADN provírico del genoma del hospedador impediría por ejemplo más multiplicación del VIH y difiere de las metodologías actuales en que tiene potencial para erradicar el virus aún latente presente en el genoma del hospedador.

Una clase de proteínas que se consideraron para su utilización en este planteamiento alternativo son las recombinasas específicas de sitio (Flowers *et al.*, 1997). Las recombinasas específicas de sitio median en una multitud de funciones en la naturaleza desde la reestructuración génica hasta la segregación de genoma, tal como por ejemplo la escisión, la inversión o la integración de unidades definidas de ADN (reseñado en Stark *et al.*, 1992).

Una de las recombinasas más sencillas y mejor comprendidas es la recombinasa Cre del bacteriófago P1 que resuelve dímeros del genoma en monómeros por recombinación entre dos sitios idénticos de ADN bicatenario de una secuencia determinada (Hoess y Abremski, 1985). La recombinasa Cre presenta un uso generalizado en la genética del ratón (Nagy, 2000). La Cre es una proteína de 38 kDa que se la denominó según su función, ya que produce recombinación (Sternberg y Hamilton, 1981). Un requisito previo para esta recombinación es la alineación de dos sitios de recombinación reconocidos por Cre en orientación antiparalela que a continuación se unen por cuatro subunidades Cre idénticas que se juntan para formar un anillo en el que cada subunidad se pone en contacto con dos subunidades adyacentes y el hemisitio de un sitio de recombinación (Hoess y Abremski, 1985). El sitio de recombinación reconocido por Cre es una secuencia de ADN bicatenario de 34 pb conocida como *loxP* (locus of crossing over (\times), P1; Sternberg y Hamilton, 1981), que es palindrómica con excepción de sus ocho pares de bases más internos (denominados separadores), que proporcionan direccionalidad al sitio.

Algunos sistemas de recombinación específica de sitio, incluida la función del sistema Cre/*loxP* sin proteínas accesorias o cofactores y funcionan bajo una amplia variedad de condiciones celulares. Sin embargo, ya que las recombinasas específicas de sitio funcionan mediante interacciones específicas de las subunidades de la enzima recombinasa con sus sitios diana de ADN afín, la utilización de estas enzimas está restringida por el requisito de que las regiones objetivos del ADN deben contener sitios diana colocados apropiadamente (Lewandoski, 2001). Hasta el momento, no se ha identificado ninguna recombinasa natural que reconozca secuencias retrovíricas naturales como sus secuencias diana de ADN.

En los últimos años se han realizado exhaustivos análisis mutacionales y estructurales de recombinasas específicas de sitio para alterar sus propiedades y lograr una mejor comprensión de los complejos mecanismos de estas enzimas (para un estudio véase Van Duyne, 2001; y Coates *et al.*, 2005). Muchos estudios se centraron en explorar la evolución de la recombinasa Cre. Varios estudios demostraron que la especificidad de objetivo de Cre podría alterarse cuando se cambiasen unos pocos nucleótidos en su sitio de reconocimiento *loxP* (Buchholz y Stewart, 2001; Santoro y Schultz, 2002; Rufer y Sauer, 2002). Más estudios estudian la ingeniería de sitios diana *loxP* mutados que contienen secuencias de LTR de VIH-1 para desarrollar sitios diana posibles para la utilización de Cre como estrategia antivírica (Lee y Park, 1998; Lee *et al.*, 2000). Hasta el momento, sin embargo, no ha sido posible generar una recombinasa que reconozca secuencias naturales de VIH asimétricas como sus secuencias diana de ADN.

El procedimiento de evolución dirigida es un procedimiento eficaz para seleccionar enzimas con especificidades alteradas (revisadas en Yuan *et al.*, 2005; y Johannes y Zhao, 2006). Al principio se utilizó este procedimiento para aislar enzimas mejoradas basándose en el ARN seleccionando moléculas de ARN con sitios del sustrato alterados. La utilización del procedimiento de la RPC permite el cribado de bancos muy grandes y la recuperación de regiones de codificación logradas de un grupo de candidatos. En la evolución dirigida de proteínas, por el contrario, el cribado y la recuperación de mutantes mejorados, que se identifican por alteraciones en las propiedades de la proteína, requiere un procedimiento para recuperar la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. El vínculo entre la proteína y su secuencia de codificación a menudo se ha mantenido por compartimentación. En consecuencia, el cribado del banco en evolución de proteína dirigida se ha limitado a planteamientos "uno por uno" que mantienen los compartimientos y no se ha dispuesto de las ventajas asociadas a mezclas de cribado de candidatos.

Esta limitación ha sido superada por el desarrollo de procedimientos que permiten la reticulación de proteínas a sus respectivos ARN mensajero (ARNm) utilizando fusiones ARNm-proteína y presentación a ribosomas. Las pantallas funcionales para las propiedades mejoradas de proteínas se acoplaron de este modo a la recuperación directa de moléculas de codificación correspondientes y grandes agrupaciones se han cribado *in vitro* (véase por ejemplo Buchholz *et al.*, 1998). Se logró una mejora adicional de la evolución de la proteína dirigida por la evolución de la proteína unida al sustrato (SLiPE; Buchholz y Stewart, 2001), en el que el sustrato de la recombinasa se colocó en la misma molécula de ADN que la zona de codificación de proteínas. De esta manera, cuando se expresó la

recombinasa dentro de un compartimiento, su acción alteró el sustrato de ADN junto a su propia zona de codificación. En consecuencia, un banco podría detectarse como una agrupación por RPC para ampliar sólo zonas de codificación candidatas que estuvieran junto a un sustrato alterado. Esto permite la detección de grandes bancos convenientemente para la rápida recuperación de las zonas de codificación logradas. Este procedimiento se aplicó para alterar la especificidad de ADN de la recombinasa Cre y adaptarla a un nuevo sitio diana de reconocimiento (Buchholz y Stewart, 2001).

Sin embargo, un inconveniente decisivo de la utilización de cualquier recombinasa para la escisión de ADN retrovívico es la necesidad de la recombinasa para sitios diana simétricos, que por lo general no se encuentran por lo menos dos veces en el ADN provívico para permitir el uso de recombinasas presentes.

A partir del potencial de recombinasas específicas de sitio y de la necesidad de encontrar una terapia del SIDA que erradique el provirus VIH-1 del genoma de la célula hospedadora, el problema subyacente de la presente invención radica de este modo en proporcionar un procedimiento para la preparación de un recombinasa adaptada, cuya recombinasa adaptada recombina sitios diana asimétricos dentro de la LTR de ADN provívico de un retrovirus insertado en el genoma de una célula hospedadora, escindiendo de este modo el provirus del genoma de la célula hospedadora.

Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada, cuya recombinasa adaptada recombina sitios diana asimétricos en la LTR de ADN provívico insertado en el genoma de una célula hospedadora que comprende las etapas siguientes:

- (a) determinar la secuencia de la LTR del ADN provívico, identificando en la misma secuencias con homología de por lo menos el 30% respecto a las secuencias de hemisitio izquierdo y de hemisitio derecho de sitios diana conocidos de recombinasas, en la que las secuencias homólogas están separadas por un separador de 5 a 12 nucleótidos, y en la que las secuencias LTR homólogas con mayor homología a un sitio diana conocido representan la secuencia diana asimétrica;
- (b) preparar dos secuencias sintéticas, en las que la primera secuencia sintética corresponde a la secuencia de la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) homóloga al hemisitio izquierdo de dicho sitio diana conocido más la secuencia separadora y se denomina "secuencia de hemisitio 1", y en la que la segunda secuencia sintética corresponde a la secuencia separadora más la secuencia de la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) homóloga al hemisitio derecho y se denomina "secuencia de hemisitio 2";
- (c) determinar los nucleótidos dentro de las secuencias sintéticas de la etapa (b) que se desvían de las correspondientes secuencias homólogas del hemisitio izquierdo y hemisitio derecho del sitio diana homólogo conocido de la etapa (a);
- (d) generar un primer subconjunto de dos secuencias diana basándose en las secuencias sintéticas de la etapa (b), en la que la primera secuencia diana en el primer subconjunto comprende una repetición invertida que consta de la secuencia de hemisitio 1 de la etapa (a) y de la secuencia de hemisitio 1' separadas por la secuencia separadora, y en la que la segunda secuencia diana en el primer subconjunto comprende una repetición invertida consistente en la secuencia de hemisitio 2' y la secuencia de hemisitio 2 de la etapa (b) separada por la secuencia separadora, en la que las secuencias de hemisitio 1' y 2' de etapa representan repeticiones invertidas de las respectivas secuencias de hemisitio 1 y 2 de la etapa (b);
- (e) generar un segundo subconjunto de secuencias diana basándose en las secuencias diana del primer subconjunto de la etapa (d), en la que cada una de las secuencias de hemisitio junto con la secuencia separadora respectiva de las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d) se utiliza para generar una secuencia diana independiente del segundo subconjunto formando una repetición invertida basándose en la secuencia de hemisitio seleccionada, de modo que la secuencia separadora separe ambas secuencias formando la repetición invertida, en la que las secuencias de ambos hemisitios que se originan a partir de una de las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d) se alteran durante su síntesis y antes de utilizar las mismas para generar la repetición invertida proporcionando la secuencia diana completa de manera que en la secuencia de hemisitio izquierdo una parte de los nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homóloga correspondiente del sitio diana conocido de la etapa (a) se sustituye por los nucleótidos naturales encontrados en el sitio diana conocido y en la secuencia del hemisitio derecho el resto de los nucleótidos que se desvían del hemisitio izquierdo homólogo correspondiente se sustituye por los nucleótidos naturales encontrados en el sitio diana conocido, de modo que en ambas secuencias de hemisitios que se originan a partir de una secuencia diana del primer subconjunto de la etapa (d) en conjunto los nucleótidos que se desvían pueden encontrarse, mientras que ninguna de dichas secuencias de hemisitio solas comprende todos los nucleótidos que se desvían;

- 5 (f) generar más subconjuntos de secuencias diana a partir de las secuencias diana en el segundo subconjunto obtenido en la etapa (e) repitiendo paso a paso el procedimiento de la etapa (e) cada vez que se genera un nuevo subconjunto de secuencias diana, hasta que las secuencias de hemisitio que forman las repeticiones invertidas dentro de cada secuencia diana generada contengan uno, dos o tres nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homólogo correspondiente del sitio diana conocido;
- 10 (g) aplicar la evolución molecular dirigida a la recombinasa que reconoce el sitio diana homólogo conocido seleccionado en la etapa (a) utilizando las secuencias diana del subconjunto final obtenido en la etapa (f) que contienen uno, dos o tres nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homóloga correspondiente de dicho sitio diana homólogo conocido como sustrato;
- 15 (h) mezclar los bancos de recombinasa desarrollados en la etapa (g);
- (i) aplicar la evolución molecular dirigida en los bancos mezclados obtenidos en la etapa (h) utilizando las secuencias diana del siguiente subconjunto superior según la etapa (f);
- 20 (j) repetir las etapas (h) e (i) hasta que se consiga por lo menos una recombinasa por evolución molecular dirigida que sea activa en la secuencia diana asimétrica dentro de la LTR del ADN retrovírico de la etapa (a);
- (k) aislar el ácido nucleico de por lo menos una recombinasa obtenida en la etapa (j) procedente del banco; y
- (l) clonar el ácido nucleico obtenido en la etapa (k) en un vector de expresión adecuado.
- 25 En una forma de realización preferida la evolución dirigida por la recombinasa molecular aplicada en las etapas (g) e (i) procede de la familia de serina integrasas o de la familia de tirosina integrasas y es preferentemente una Cre recombinasa modificada del fago PI, una FLP recombinasa modificada de levadura o una Dre recombinasa modificada del fago D6. Preferentemente la evolución molecular dirigida es la evolución de la proteína unida al sustrato (SLiPE). El vector de expresión que codifica la recombinasa adaptada es preferentemente un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector de espumavirus o un vector adenovírico.
- 30 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a la utilización médica de un vector de expresión que codifica la recombinasa adaptada o una célula madre adulta que comprende dicho vector de expresión para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la reducción de la carga vírica en un paciente infectado por un retrovirus. La composición farmacéutica puede administrarse a un paciente para tratar la infección con una amplia gama de retrovirus, tal como por ejemplo el VIH. La composición farmacéutica de la presente invención se utiliza preferentemente para administración simultánea con otros agentes activos de la terapia antirretrovírica hiperactiva (TARHA) o para administración simultánea o posterior a la terapia de activación inmunitaria global o la activación específica de la expresión génica del provirus.
- 35 Según un tercer aspecto de la presente invención está previsto un procedimiento *in vitro* de optimización del tratamiento de una infección retrovírica de un paciente, en el que el procedimiento comprende las etapas siguientes:
- 40 (a) determinar la secuencia de ácido nucleico del ADN retrovírico presente en una muestra de sangre de un paciente;
- 45 (b) explorar en la secuencia de LTR de la secuencia de la etapa (a) las secuencias de recombinación conocidas para las que ya se han preparado recombinasas específicamente adaptadas;
- 50 (c) en caso de que exista por lo menos una de dichas secuencias de recombinación conocidas, entonces un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la recombinasa específicamente adaptada que reconoce dicha secuencia de recombinación conocida, dicha recombinasa adaptada, una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de dicha recombinasa adaptada o una célula madre adulta que comprende dicho vector de expresión se prepara como composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en el paciente; de lo contrario las secuencias con homología por lo menos del 30% con las secuencias de hemisitio izquierdo y de hemisitio derecho de los sitios diana conocidos de una recombinasa, en las que las secuencias homólogas están separadas por un separador de 5 a 12 nucleótidos, se identifican y denominan "secuencia diana asimétrica";
- 55 (d) realizar las etapas (b) a (l) del procedimiento mencionado anteriormente para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada que recombina específicamente la secuencia diana asimétrica identificada en la LTR de ADN provírico; y
- 60 (e) preparar el vector de expresión obtenido en la etapa (d), una proteína o una proteína de fusión expresada a partir de dicho vector de expresión o una célula madre transfectada o infectada con dicho vector de expresión como una composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en el paciente.
- 65

En una forma de realización preferida la evolución molecular dirigida aplicada en la etapa (d) se aplica a una recombinasa adaptada que reconoce ya un sitio diana diferente de las de las recombinasas naturales.

5 En otra forma de realización preferida la recombinasa adaptada obtenida en los procedimientos anteriores está incluida en un conjunto de recombinasas específicamente adaptadas.

La invención se refiere además a una colección de recombinasas adaptadas, que reconoce cada una distintos sitios diana en el genoma de un provirus.

10 **Descripción detallada de la invención**

Está previsto por primera vez un procedimiento que utiliza un procedimiento combinatorio de evolución de las proteínas unidas al sustrato para generar una recombinasa adaptada que reconoce la secuencia asimétrica dentro de la secuencia de un provirus integrado en el genoma de las células hospedadoras.

15 La evolución dirigida es un procedimiento de laboratorio utilizado en moléculas seleccionadas para producir mutaciones e identificar adaptaciones ulteriores a las nuevas propiedades. Por lo tanto, es un procedimiento eficaz para seleccionar enzimas con especificidades alteradas (Yuan *et al.*, 2005, Johannes y Zhao, 2006). Un requisito previo de evolución dirigida es una enzima de partida que tiene actividad residual para permitir que la estrategia de evolución tenga éxito (Bloom *et al.*, 2005). Una enzima que no tiene ninguna actividad sobre un sustrato es poco probable que produzca variantes que actúen ahora en la diana distante.

25 El procedimiento de la presente invención también puede aplicarse para adaptar proteínas que modifican ADN en general. Sin embargo, resultan preferidas las recombinasas. El término "proteína para modificar ADN" significa que incluye cualquier proteína cuya actividad provoca un cambio en la secuencia o la estructura del ácido nucleico. Los ejemplos de proteínas que modifican ADN adecuadas para ser adaptadas por el procedimiento de la presente invención incluyen las proteínas implicadas en la recombinación homóloga, exonucleasas, ADN metilasas, ADN ligasas, endonucleasas de restricción, topoisomerasas, transposasas y resolvasas.

30 Aunque el potencial de recombinasas adaptadas obtenidas por evolución dirigida ha sido ampliamente reconocido (véase, por ejemplo, Collins *et al.*, 2003), ningún procedimiento, sin embargo, ha tenido éxito hasta ahora para alterar las propiedades de una recombinasa para recombinar una secuencia retroviral natural. Flowers *et al.* (1997) han demostrado que Cre puede reducir la carga viral en las células cuando el virus contiene sitios de *loxP* naturales. Además Lee *et al.* (2000) demostraron que Cre puede volver a combinar una secuencia separadora seleccionada del genoma del VIH-1. Un problema fundamental en estos planteamientos consiste en que por lo general los LTR del VIH no presentan sitios diana simétricos que sean reconocidos por las recombinasas naturales, tales como por ejemplo la Cre recombinasa que reconoce una repetición simétrica invertida de 13 pb con un separador de 8 pb. Esta limitación ha sido estudiada por Saraf-Levy *et al.* (2006) quienes desarrollaron recombinasas heteroespecíficas, que se une cada una a un hemisito diana de una secuencia diana que estaban en secuencias diferentes. Se demostró que en este caso las dos recombinasas diferentes pueden recombinar juntas un sitio diana asimétrico. Sin embargo, este planteamiento tiene el principal inconveniente de que tendrían que estar presentes dos recombinasas diferentes en la celda diana. Considerados en conjunto, ninguno de los planteamientos desarrollados hasta la fecha en la técnica anterior ha podido suministrar una única recombinasa que pueda volver a combinar una secuencia natural en un genoma retroviral.

45 Los presentes inventores fueron los primeros en apreciar que podían adaptarse recombinasas que reconozcan sitios diana asimétricos distintos de sus sitios diana simétricos naturales dividiendo el sustrato en un número de subconjuntos nuevos con diferencias más pequeñas que la diana original y adaptando paso a paso las recombinasas para que reconozcan estos subconjuntos (véase la figura 1). Además, un procedimiento combinatorio, permite entonces la selección de moléculas funcionales que reconocen el sitio diana asimétrico en una secuencia determinada. Por lo tanto, utilizando un nuevo planteamiento de atravesar los compuestos intermedios del sustrato durante la evolución molecular dirigida los inventores pueden producir enzimas con nuevas especificidades objetivo asimétricas pasadas.

50 El procedimiento de la presente invención para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada, la cual recombina los sitios diana asimétricos dentro de la LTR del ADN proviral insertado en el genoma de una célula hospedadora, proporciona vectores de expresión que codifican recombinasas adaptadas que recombinan los sitios diana asimétricos diferentes del sitio diana de la recombinasa natural. El procedimiento de la invención comprende las etapas siguientes:

60 (a) determinar la secuencia de la LTR del ADN proviral, identificando en la misma secuencias con homología de por lo menos el 30% de las secuencias de hemisito izquierdo y de hemisito derecho de los sitios diana conocidos de recombinasas, en las que las secuencias homólogas están separadas por un separador de 5 a 12 nucleótidos, y en las que las secuencias LTR homólogas con mayor homología a un sitio diana conocido representan la secuencia diana asimétrica;

- 5 (b) preparar dos secuencias sintéticas, en las que la primera secuencia sintética corresponde a la secuencia de la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) homóloga al hemisitio izquierdo de dicho sitio diana conocido más la secuencia separadora y se denomina "secuencia de hemisitio 1", y en la que la segunda secuencia sintética corresponde a la secuencia separadora más la secuencia de la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) homóloga al hemisitio derecho y se denomina "secuencia de hemisitio 2";
- 10 (c) determinar los nucleótidos dentro de las secuencias sintéticas de la etapa (b) que se desvían de las correspondientes secuencias homólogas de hemisitio izquierdo y hemisitio derecho del sitio diana homólogo conocido de la etapa (a);
- 15 (d) generar un primer subconjunto de dos secuencias diana basándose en las secuencias sintéticas de la etapa (b), en las que la primera secuencia diana en el primer subconjunto comprende una repetición invertida constituida por la secuencia de hemisitio 1 de la etapa (a) y de la secuencia de hemisitio 1' separadas por la secuencia separadora, y en las que la segunda secuencia diana en el primer subconjunto comprende una repetición invertida que consta de la secuencia de hemisitio 2' y la secuencia de hemisitio 2 de la etapa (b) separadas por la secuencia separadora, en las que la secuencias de hemisitio 1' y 2' representan repeticiones invertidas de las secuencias de hemisitio 1 y 2 respectivas de la etapa (b);
- 20 (e) generar un segundo subconjunto de secuencias diana basándose en las secuencias diana del primer subconjunto de la etapa (d), en la que cada una de las secuencias de hemisitio junto con la secuencia separadora respectiva de las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d) se utiliza para generar una secuencia diana independiente del segundo subconjunto formando una repetición invertida basándose en la secuencia de hemisitio seleccionada, de modo que la secuencia separadora separe ambas secuencias formando la repetición invertida, en la que las secuencias de ambas secuencias de hemisitio que se originan a partir de una de las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d) se alteran durante su síntesis y antes de utilizar las mismas para generar la repetición invertida proporcionando la secuencia diana completa de manera que en la secuencia de hemisitio izquierdo una parte de los nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homólogo correspondiente del sitio diana conocida de la etapa (a) se sustituye por los nucleótidos naturales encontrados en el sitio diana conocido y en la secuencia de hemisitio derecho el resto de los nucleótidos que se desvían del hemisitio izquierdo homólogo correspondiente se sustituye por los nucleótidos naturales encontrados en el sitio diana conocido, de modo que en ambas secuencias de hemisitio que se originan a partir de una secuencia diana del primer subconjunto de la etapa (d) considerando que todos los nucleótidos que se desvían pueden encontrarse, mientras que ninguna de dichas secuencias de hemisitio solas comprende todos los nucleótidos que se desvían;
- 35 (f) generar más subconjuntos de secuencias diana a partir de las secuencias diana en el segundo subconjunto obtenido en la etapa (e) repitiendo paso a paso el procedimiento de la etapa (e) cada vez que se genera un nuevo subconjunto de secuencias diana, hasta que las secuencias de hemisitio que forman las repeticiones invertidas dentro de cada secuencia diana generada contengan uno, dos o tres nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homóloga correspondiente del sitio diana conocido;
- 40 (g) aplicar la evolución molecular dirigida a la recombinasa que reconoce el sitio diana homólogo conocido seleccionado en la etapa (a) utilizando las secuencias diana del subconjunto final obtenido en la etapa (f) que contienen uno, dos o tres nucleótidos que se desvían de la secuencia homóloga a la secuencia de hemisitio correspondiente de dicho sitio diana homólogo conocido como sustrato;
- 45 (h) mezclar los bancos de recombinasa desarrollados en la etapa (g);
- 50 (i) aplicar la evolución molecular dirigida en los bancos mezclados obtenidos en la etapa (h) utilizando las secuencias diana del siguiente subconjunto superior según la etapa (f);
- (j) repetir las etapas (h) e (i) hasta que se consiga por lo menos una recombinasa por evolución molecular dirigida que sea activa en la secuencia diana asimétrica dentro de la LTR del ADN retrovírico de la etapa (a);
- 55 (k) aislar el ácido nucleico de por lo menos una recombinasa obtenida en la etapa (j) procedente del banco; y
- (l) clonar el ácido nucleico obtenido en la etapa (k) en un vector de expresión adecuado.

60 En la etapa (a) del procedimiento de la presente invención se determina la secuencia de la LTR del ADN provírico, como por ejemplo por secuenciación del ADN utilizando inhibidores de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977). Sin embargo, si ya se ha determinado la secuencia de la LTR del ADN retrovírico insertado en el genoma del anfitrión, puede omitir esta etapa. Además es posible utilizar secuencias conocidas de bases de datos de secuencias. Basándose en la información de secuencias se realizan análisis informáticos de información de secuencias para identificar en éstas secuencias con homología de por lo menos el 30% con las secuencias de hemisitio izquierdo y de hemisitio derecho de los sitios diana conocidos, respectivamente, de recombinasas conocidas que están separadas por un separador adecuado de 5 a 12 nucleótidos.

El término "recombinasa" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una proteína involucrada en la recombinación. Como tales las recombinasas reconocen y enlazan dos secuencias de ADN específicas denominadas "sitios de recombinación" o "sitios diana" y median en la recombinación entre estos dos sitios diana. Por lo tanto, el término "recombinasa" se refiere a cualquier componente de proteínas de cualquier sistema recombinante que media en reconfiguraciones del ADN en un locus específico de ADN. Las recombinasas naturales reconocen sitios diana simétricos constituidos por dos secuencias idénticas denominadas "hemisitio" de aproximadamente 9 a 20 pb formando una repetición invertida, en el que las secuencias de hemisitio están separadas por una secuencia separadora de 5 a 12 pb.

Es de destacar que en la presente invención y también en esta materia los términos "secuencia diana", "sitio diana" y "sitio de recombinación" se utilizan indistintamente.

Al contrario que las recombinasas naturales que reconocen sitios diana simétricos, el procedimiento de la presente invención proporciona recombinasas adaptadas que reconocen sitios diana, que no consisten en secuencias palindrómicas, separadas por un separador. En su lugar, en los sitios diana asimétricos las secuencias no forman una repetición invertida simétrica. Por consiguiente, una recombinasa adaptada capaz de reconocer un sitio diana asimétrico debería reconocer y recombinar sitios diana consistentes en hemisitios de secuencia variable.

Dentro de un sitio diana asimétrico las secuencias denominadas "hemisitio izquierdo" y "hemisitio derecho", respectivamente, se definen por su homología con el hemisitio izquierdo y derecho de un sitio diana conocido. La secuencia situada entre las secuencias homólogas al hemisitio izquierdo y derecho de un sitio diana conocido se denomina separador.

Sin embargo, si las secuencias se encuentran en la LTR que tienen sólo homología con la secuencia del hemisitio izquierdo o derecho de un sitio diana conocido, estas secuencias podrían utilizarse sin embargo en la práctica de la presente invención. Un experto en la materia conoce el tamaño del sitio diana que pertenece a la recombinasa, cuya secuencia diana natural presenta homología con las secuencias dentro de la LTR. Por ejemplo, si la homología se encuentra dentro de la secuencia LTR a una secuencia diana reconocida por la Cre recombinasa, constaría de 34 nucleótidos con dos secuencias de hemisitio de 13 nucleótidos separadas cada una por un separador de 8 nucleótidos. Por consiguiente, la secuencia homóloga dentro de la LTR se define como el hemisitio izquierdo o derecho o el separador del sitio diana asimétrico dependiendo de la homología con la secuencia del sitio diana conocido. Por lo tanto, secuencias con homología al hemisitio izquierdo de una secuencia diana conocida como secuencias simétrica del hemisitio izquierdo con homología al hemisitio derecho de una secuencia diana conocida se definen como el hemisitio derecho. A partir de esta definición, las demás partes de los sitios diana asimétricos se definen en consideración de la estructura del sitio diana conocido. Por lo tanto, una vez definida por ejemplo una secuencia del hemisitio derecho dentro de la LTR sobre la homología con una zona de *loxP* (reconocida por Cre recombinasa), las demás secuencias correspondientes al separador y el hemisitio izquierdo de la secuencia diana asimétrica se pueden definir fácilmente. La secuencia separadora se define por ejemplo contando 8 nucleótidos corriente arriba del extremo 5' de la secuencia definida como secuencia de hemisitio derecho, mientras que la secuencia de hemisitio izquierdo se define igualmente contando 13 nucleótidos corriente arriba del extremo 5' de la secuencia separadora definida anteriormente.

Homología en el presente contexto, así como a lo largo de la solicitud significa similitud o identidad de secuencia, resultando preferida la identidad. Una comparación preferida para la homología es comparar por lo menos dos secuencias utilizando técnicas normales conocidas en la materia, incluyendo pero sin limitarse, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) o la búsqueda por el procedimiento de similitud de Pearson y Lipman (1988). En el contexto de la presente invención homología de la secuencia de aplicación se determina preferentemente utilizando el programa informático ClustalW disponible desde el Instituto Europeo de Bioinformática (IBE), salvo indicación contraria.

Debido al requisito de dos sitios diana idénticos que deben estar presentes en el genoma del provirus para permitir a la recombinasa escindir la secuencia entre estos dos sitios diana, las secuencias del ADN provírico se exploran en la etapa (a) del procedimiento de la presente invención que están presentes por lo menos dos veces en el genoma. Dichas secuencias son, por ejemplo, las secuencias LTR del ADN provírico. Por consiguiente, la secuencia de la LTR se explora preferentemente, ya que la 5'-LTR y la 3'-LTR del ADN provírico son idénticas. Un sitio diana asimétrico presente en la 5'-LTR también está presente en la 3'-LTR y por lo tanto permite la escisión del ADN provírico situado entre las LTR.

Fuera de las secuencias identificadas dentro de la secuencia LTR con suficiente homología con secuencias de sitios diana conocidos se seleccionan preferentemente los que tienen la mayor homología con la secuencia del sitio diana de recombinasas conocidas. Sin embargo, también es posible seleccionar otras secuencias distintas de las que tienen la mayor homología.

Debe apreciarse que el potencial del procedimiento de la presente invención incluso permite adaptar recombinasas que reconocen sitios diana asimétricos con menos del 30% de homología con sitios diana conocidos. Sin embargo,

- para asegurar la presencia de actividad de recombinación residual para el sitio diana asimétrico respectivo, preferentemente se exploran las secuencias que tienen una homología de por lo menos el 30% con las secuencias simétricas del hemisitio izquierdo y las de hemisitios derechos de sitios diana conocida de recombinasas conocidas. En las formas de realización más preferidas se exploran secuencias que tienen una homología de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80%, más preferentemente 85%, en especial preferentemente 90% y más preferentemente 95% con las secuencias simétricas del hemisitio izquierdo y del hemisitio derecho de la mitad de sitios diana conocidos de recombinasas conocidas.
- En una forma de realización preferida de la presente invención la secuencia seleccionada con en la LTR presenta homología con los sitios diana *loxP* simétricos reconocidos por la Cre recombinasa específica para la zona. En una forma de realización más preferida la secuencia del sitio diana asimétrico es 5'-ACAACATCCTATTACACCCTATATGCCAACATGG-3' (SEC ID nº 2) (Figura 2A).
- En la etapa (b) las secuencias seleccionadas dentro de la LTR homóloga con un sitio diana conocido se utilizan para la preparación de dos secuencias sintéticas. Estas secuencias sintéticas se preparan como secuencias de oligonucleótido por los procedimientos conocidos en la técnica. La secuencia de la primera secuencia sintética (denominada "secuencia de hemisitio 1") corresponde a la secuencia del sitio diana asimétrico seleccionado dentro de la LTR del provirus homóloga al hemisitio izquierdo del sitio diana conocido e incluye la secuencia entre las secuencias que representan el hemisitio izquierdo y derecho, que se conoce como el separador. La segunda secuencia sintética corresponde a la secuencia separadora y la secuencia del sitio diana asimétrico seleccionado dentro de la LTR del provirus homólogo con el hemisitio derecho del sitio diana conocido. Esta segunda secuencia de oligonucleótido se denomina "secuencia del hemisitio 2".
- La secuencia separadora en ambas secuencias sintéticas es preferentemente idéntica y corresponde a la secuencia de la representación de LTR o se define como la secuencia separadora del sitio diana asimétrico. Sin embargo, en una forma de realización más la secuencia separadora de ambas secuencias sintéticas comprende una o dos desviaciones de la secuencia. Las desviaciones son preferentemente sustituciones de nucleótidos que mantienen la longitud original de la secuencia separadora.
- En la etapa (c) los nucleótidos dentro de "secuencia del hemisitio 1" y "secuencia del hemisitio 2", respectivamente, del primer subconjunto de secuencias sintéticas de la etapa (b) que se desvían de las correspondientes secuencias homólogas del hemisitio izquierdo y del hemisitio derecho de la diana seleccionada conocida se determinan por el alineamiento de secuencias y comparación de secuencias. En este contexto, la secuencia de "secuencia del hemisitio 1" se compara con la correspondiente hemisitio natural, que es preferentemente la secuencia del hemisitio izquierdo, mientras que la secuencia de "secuencia del hemisitio 2" se compara con otros hemisitios formando el sitio diana natural palindrómico, que es preferentemente la secuencia del hemisitio derecho.
- Este procedimiento no debe realizarse necesariamente después de etapa (b) y antes de etapa (d) del procedimiento de la invención, pero también puede realizarse en una fase diferente del procedimiento después de etapa (a) y antes de etapa (e).
- En la etapa (d), se genera un primer subconjunto de dos secuencias diana utilizando las secuencias sintéticas de etapa (b). Las secuencias diana del primer subconjunto son secuencias de oligonucleótido palindrómicas que tienen la estructura de un sitio diana simétrico. Estos sitios diana simétricos artificiales son sintetizadas basándose en las medias secuencias de hemisitio de etapa (b) completando la secuencia del hemisitio que falta en cada secuencia de oligonucleótido como repetida invertida, en la que la secuencia de "secuencia del hemisitio 1" y la "secuencia del hemisitio 2", respectivamente, se utiliza para complementar la segunda secuencia de hemisitio en el extremo opuesto de la secuencia separadora. Por consiguiente, la primera secuencia diana en el primer subconjunto (denominada "secuencia 1" diana) comprende una repetición invertida consistente en la "secuencia del hemisitio 1" y "secuencia del hemisitio 1" repetida a la inversa separadas por la secuencia separadora, mientras que la segunda secuencia diana en el primer subconjunto (denominada "secuencia 2 diana") comprende una repetición invertida que consta de "secuencia del hemisitio 2" repetida a la inversa y la "secuencia del hemisitio 2" separadas por la secuencia separadora (véase la figura 1). En la "secuencia diana 1" la secuencia se coloca de la forma siguiente: 5'-"secuencia del hemisitio 1"-separador-"secuencia del hemisitio 1" -3', en la "secuencia diana 2" la secuencia se coloca de la forma siguiente: 5' -"secuencia del hemisitio 2"-separador-"secuencia del hemisitio 2" -3'.
- De manera similar a lo expuesto anteriormente en la etapa (b), las secuencias separadoras dentro de cada dos secuencias diana sintéticas del primer subconjunto son preferentemente idénticas y corresponde a la secuencia de la representación de LTR o se define como la secuencia separadora del sitio diana asimétrico. Sin embargo, en una forma de realización más las secuencias separadoras pueden comprender una o dos desviaciones de la secuencia procedentes de sustituciones de nucleótidos.
- Generalmente, esta etapa representa una primera división de las secuencias del sitio diana asimétrico seleccionada para adaptar una recombinasa específica (véase la figura 1). Las secuencias se generan en esta etapa que aloja sitios diana simétricos derivados de hemisitios del sitio diana asimétrico seleccionado para adaptar una recombinasa

específica (véase la figura 1). Como consecuencia, cada mutación (es decir, la diferencia con el sitio diana reconocido por la recombinasa natural) presente en el hemisitio de dicho sitio diana asimétrico se ha extendido ahora entre las secuencias diana simétricas en el primer subconjunto.

5 En la etapa (e) del procedimiento de la presente invención las secuencias diana del primer subconjunto se utilizan para generar un segundo subconjunto de secuencias diana. Cada una de las secuencias de hemisitio y el separador respectivo de las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d) se utilizan independientemente para generar una nueva secuencia diana (es decir, formando el segundo subconjunto) generando una repetición invertida basándose en la secuencia del hemisitio seleccionada, de modo que la secuencia separadora separa ambas
 10 secuencias que forman la repetición invertida (véase la figura 1). De este modo, la secuencia del hemisitio izquierdo de la "secuencia diana 1" se utiliza para generar un primer sitio diana simétrico, la secuencia del hemisitio derecho de la "secuencia diana 1" se utiliza para generar un segundo nuevo sitio diana simétrico, la secuencia del hemisitio izquierdo de la "secuencia diana 2" se utiliza para generar un tercer nuevo sitio diana simétrico y la secuencia del hemisitio derecho de la "secuencia diana 2" por último se utiliza para generar un nuevo cuarto sitio diana simétrico,
 15 en la que cada vez la secuencia separadora de la secuencia diana original está incluida en el nuevo sitio diana simétricos (véase la figura 1). Sin embargo y lo más importante, las secuencias de hemisitio procedentes de cada una de las secuencias diana del primer subconjunto se alteran durante su síntesis y antes de utilizar las mismas para generar la repetición invertida que proporciona la nueva secuencia diana completa (como, por ejemplo, realizando sustituciones de nucleótidos). En la secuencia del hemisitio izquierdo de una nueva secuencia diana (procedente de una secuencia diana del primer subconjunto) una parte de los nucleótidos que se desvían de la secuencia de la mitad homóloga correspondiente de la secuencia diana conocida de la etapa (a) se sustituye por los nucleótidos naturales que se encuentran en la secuencia diana conocida y en la secuencia del hemisitio derecho correspondiente (procedente de la misma secuencia diana del primer subconjunto) el resto de los nucleótidos que se desvían del hemisitio izquierdo homólogo correspondiente se sustituye por nucleótidos naturales que se encuentran
 20 en la secuencia diana conocida (véase la figura 1). Los nucleótidos alterados en el hemisitio izquierdo son diferentes de los modificados en el hemisitio derecho, de modo que los nucleótidos que se desvían están presentes solo una vez en ambos de las secuencias de hemisitio que se originan a partir de secuencias diana del primer subconjunto, ya sea en las secuencias diana formadas basándose en el hemisitio izquierdo o en la secuencia diana formada basándose en el hemisitio derecho (véase la figura 1). Además, la alteración de la secuencia se lleva a cabo de modo que cada nucleótido que se desvía se mantiene una vez en una de los hemisitios. Por último, ninguna de las secuencias de hemisitio simétricas solas debe comprender todos los nucleótidos que se desvían.

Como ya se indicó anteriormente en las etapas (b) y (d) las secuencias separadoras en cada dos secuencias diana sintéticas de un nuevo subconjunto procedentes de una secuencia diana sintética de un subconjunto mayor son preferentemente idénticas y corresponde a la secuencia de la LTR que representa o se define como la secuencia separadora del sitio diana asimétrico. Sin embargo, en una forma de realización adicional las secuencias separadoras pueden comprender una o dos desviaciones de la secuencia que se originan a partir de sustituciones de nucleótidos.

40 Utilizando este procedimiento, el número de mutaciones (es decir, diferencias del sitio diana reconocidas por la recombinasa natural) en las secuencias diana que representan cada subconjunto es menor que en la secuencia diana asimétrica de partida, pero todas las mutaciones están todavía representadas en una de las secuencias diana (véase la figura 1).

45 El término "nucleótidos que se desvían" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un nucleótido dentro de una secuencia diana asimétrica identificado o definido dentro de la LTR o dentro de una secuencia diana de un subconjunto generado según la presente invención que se desvía (es decir, es diferente) de los nucleótidos presentes en la misma posición en la secuencia homóloga correspondiente de la conocida secuencia diana simétrica homóloga de una recombinasa conocida seleccionada en la etapa (a) del procedimiento de la presente invención. En este contexto, la terminología "nucleótidos que se desvían" y "mutaciones" se utilizan indistintamente.

Más generalmente en la figura 1, se muestra un ejemplo de la generación de subconjuntos de secuencias diana. Un ejemplo más específico basado en una secuencia asimétrica dentro de la LTR de un provirus VIH se muestra en la figura 2A.

55 En la etapa (f) se generan más subconjuntos de secuencias diana a partir de las secuencias diana del segundo subconjunto repitiendo paso a paso el procedimiento de la etapa (e), es decir, dividiendo las secuencias diana en las respectivas secuencias de hemisitio y generando nuevas estructuras palindrómicas basadas en estas secuencias de hemisitio después de alterar la secuencia del hemisitio procedente de una secuencia diana del segundo subconjunto, generando cada vez un nuevo subconjunto de secuencias diana, hasta las secuencias de hemisitio simétricas utilizadas para generar las repeticiones invertidas contienen uno, dos o tres nucleótidos que se desvían de la correspondiente secuencia del hemisitio homóloga del sitio diana conocido.

65 En el contexto de la presente invención se apreció que las recombinasas pueden ser adaptadas utilizando evolución molecular dirigida mediante secuencias diana como sustrato, si la secuencia diana se utiliza como sustrato difiere en no más de 3 nucleótidos de la secuencia diana natural. Por lo tanto, la generación de subconjuntos de diferentes

órdenes descritos anteriormente sirve para reducir el número de nucleótidos que se desvían por secuencia diana a 3 o menos (véase figura 1). La reducción paso a paso del número de nucleótidos que se desvían finalmente proporciona un número de subconjuntos de secuencias diana de diferentes órdenes con número decreciente de nucleótidos que se desvían hasta que se crea un subconjunto final que puede utilizarse como un sustrato para evolución molecular dirigida. Mientras se crean los subconjuntos diferentes y se reducen con ello el número de nucleótidos que se desvían, las diferencias con el sitio diana reconocido por la recombinasa natural se propagan entre varias secuencias diana que no comprenden más de 3 de estos nucleótidos que se desvían cada uno, mientras que las secuencias diana del orden final como un conjunto representan aún todos los nucleótidos que se desvían (véase la figura 1).

Partiendo el segundo subconjunto de secuencias diana obtenido en la etapa (e) se genera un tercer subconjunto, seguido de un cuarto, quinto, sexto, etc. subconjunto si es necesario. Sin embargo, la generación del tercer subconjunto generalmente sólo es necesaria, si las secuencias diana del segundo subconjunto contienen aún más de tres nucleótidos que se desvían. Lo mismo se aplica a la generación de los subconjuntos siguientes, que sólo son necesarios, si las secuencias diana del subconjunto previo contienen aún más de tres nucleótidos que se desvían. Debe apreciarse que en una forma de realización se generarán subconjuntos de secuencias diana hasta que las secuencias diana del subconjunto final sólo comprendan un nucleótido que se desvía. Por consiguiente, dependiendo del número de nucleótidos que se desvían en cada secuencia del hemisitio el número de subconjuntos generados para cada secuencia del hemisitio del sitio diana asimétrico puede diferir. Por ejemplo, puede ser necesario generar sólo dos subconjuntos para la secuencia de hemisitio izquierdo, mientras que tres o cuatro subconjuntos deben generarse para el hemisitio derecho a fin de difundir los nucleótidos que se desvían entre varias secuencias diana de modo que una sola secuencia diana no comprende más de 3 de estos nucleótidos que se desvían.

El principio que consiste en generar más subconjuntos de las secuencias diana para reducir el número de nucleótidos que se desvían a números inferiores a tres se ilustra en la figura 1.

En la etapa (g) se aplica un procedimiento de evolución dirigida molecular sobre la recombinasa que reconoce el sitio diana homólogo conocido de la etapa (a) utilizando las secuencias diana del subconjunto final obtenido en la etapa (f) que contiene una, dos o tres nucleótidos que se desvían de la correspondiente secuencia de hemisitio homólogo de dicho sitio diana homólogo conocido como sustrato.

La expresión "subconjunto final" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al último subconjunto generado en la etapa (f). Dependiendo del número de nucleótidos que se desvían en el sitio diana asimétrico y del número de subconjuntos que han de generarse para reducir el número de nucleótidos que se desvían por secuencia diana inferior a 3, el subconjunto "final" puede corresponder a cualquier subconjunto, por ejemplo al segundo, tercero, cuarto o a un subconjunto posterior y puede ser diferente de las secuencias de hemisitio simétricas de la secuencia diana asimétrica dentro de la LTR.

Los procedimientos de evolución molecular dirigida, conocidos también como evolución de laboratorio o evolución *in vitro*, son conocidos en la técnica (para un estudio véase Yuan *et al.*, 2005 y referencias en este documento; Johannes y Zhao, 2006).

En una primera etapa de evolución molecular dirigida, los bancos de secuencias de recombinasa mutadas al azar son generados por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando RCP propensa a error y mezclado de ADN (estudiado en, por ejemplo, Yuan *et al.*, 2005), o los procedimientos dados a conocer en la solicitud de patente internacional WO 02/44409. Los plásmidos de cada banco que comprenden la recombinasa mutada contienen también una de las secuencias diana del subconjunto final obtenido en la etapa (f). Después de la transfección del banco de plásmidos generado en células apropiadas, la expresión de la recombinasa está habilitada y la evolución molecular dirigida se lleva a cabo como conoce un experto en la materia.

En una forma de realización preferida la evolución molecular dirigida utilizada en la etapa (g) del procedimiento de la presente invención es la evolución de proteína unida al sustrato (SLiPE; Buchholz y Stewart, 2001; solicitud de patente internacional WO 02/44409). La evolución de la proteína unida al sustrato se lleva a cabo como se describe con detalle en los ejemplos. En resumen, las secuencias diana obtenidas en la etapa (f) se clonan en un plásmido (el denominado vector de evolución) junto con una secuencia de codificación mutada al azar para la recombinasa. La mutación aleatoria se lleva a cabo mediante RCP propensa a error (véase Buchholz y Stewart, 2001). El banco de plásmidos generado se transfecta entonces DNA en células de *E. coli* para permitir la expresión de la recombinasa. Utilizando un activador inducible para conducir la expresión de la recombinasa es posible ajustar los niveles de expresión. Después de una noche de incubación, el ADN plásmido se aísla de las células y se digiere con *NdeI* para cortar los plásmidos que no se recombinaron y sólo los plásmidos recombinados se amplían posteriormente con cebadores. El producto de la RCP de la forma recombinada del plásmido produce una banda de 1,7 Kb. El producto de la RCP se digiere con *BsrGI* y *XbaI* y se vuelve a subclonar en el vector de evolución digerido igualmente para el próximo ciclo de evolución.

En la etapa (h) los bancos de recombinasa evolucionados en la etapa (g) se combinan y mezclan al azar. La

tecnología de mezclado al azar de ADN es conocida en la materia (para una consulta véase Minshull y Stemmer, 1999; Stemmer, 1994).

5 El banco combinado y mezclado al azar se clona a continuación en una nueva generación de vectores que comprende las secuencias diana del siguiente subconjunto superior generado en la etapa (f).

10 La expresión "siguiente subconjunto superior" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al subconjunto utilizado para generar un determinado subconjunto. Por ejemplo, el tercer subconjunto se generó basándose en las secuencias diana del segundo subconjunto. De este modo, a partir del tercer subconjunto el "siguiente subconjunto superior" será el segundo subconjunto. Además, el siguiente subconjunto superior a partir del segundo subconjunto es el primer subconjunto. Puede aplicarse asimismo al tercer cuarto (y así sucesivamente) subconjunto y el siguiente subconjunto superior a partir de este primer subconjunto es la secuencia diana asimétrica con la secuencia LTR.

15 En la etapa (i) el procedimiento de evolución molecular dirigida se aplica al banco mezclado al azar obtenido en la etapa (h) utilizando la secuencia diana del siguiente subconjunto superior según la etapa (f). En esta etapa puede utilizarse el mismo procedimiento de evolución molecular dirigida como las aplicadas anteriormente en la etapa (g), pero también es posible utilizar un procedimiento diferente de evolución molecular dirigida en esta etapa del procedimiento de la presente invención. Los ejemplos de diferentes procedimientos de evolución molecular dirigida fueron descritos por ejemplo por Yuan *et al.* (2005).

20 Se aplica también preferentemente el procedimiento de la evolución de la proteína unida al sustrato en los bancos combinados y mezclados al azar.

25 Esta etapa proporciona recombinasas que reconocen y recombinan secuencias diana que alojan la combinación (y por lo tanto números crecientes) de mutaciones de las diferentes secuencias diana del subconjunto inferior. Los inventores fueron los primeros en demostrar que la combinación de mutaciones de los diferentes bancos de un subconjunto inferior de secuencias diana produce efectos sinérgicos y conduce a la generación de recombinasas, que ahora recombinan secuencias diana de un subconjunto superior, demostrando que se puede utilizar una estrategia de evolución que atraviesa a través de intermediarios para conseguir una actividad deseada.

30 En la etapa (j), las etapas (h), es decir, combinando y mezclando al azar bancos de recombinasa e (i), es decir, la aplicación de la evolución molecular dirigida en los bancos combinados y mezclados al azar, se repiten hasta que se consiga por lo menos una recombinasa que sea activa en la secuencia diana asimétrica presente en el LTR del ADN provírico. Por ejemplo, en un procedimiento en el que la generación de tres subconjuntos de secuencias diana era necesaria para generar secuencias diana con sólo una, dos o tres desviaciones de nucleótidos, los bancos de recombinasa evolucionadas por ejemplo para el tercer subconjunto de secuencias diana se combinan y se mezclan al azar y la evolución molecular dirigida se aplica en este banco mezclado al azar utilizando las secuencias diana del segundo subconjunto. Las bancos de recombinasa evolucionados de este modo se combinan y se mezclan al azar y la evolución molecular dirigida se aplica en este banco utilizando las secuencias diana del primer subconjunto. En la etapa siguiente (y último) la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) en la LTR del ADN provírico se utiliza para evolucionar el banco de recombinasa que comprende recombinasas que reconocen las secuencias diana del primer subconjunto por evolución molecular dirigida a obtener por lo menos una recombinasa que sea activa en la secuencia diana asimétrica dentro de la LTR del ADN retrovírico.

45 En esta etapa el procedimiento de la evolución molecular dirigida preferentemente es el procedimiento de evolución de la proteína unida al sustrato.

50 En la etapa (k) el ácido nucleico de por lo menos una recombinasa con actividad en la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) dentro de la LTR del ADN retrovírico se aísla del banco. El ácido nucleico se aísla del plásmido respectivo mediados dentro del banco utilizando enzimas de restricción apropiadas. Los procedimientos de digestión de las endonucleasas de restricción son conocidos por los expertos en la materia. El ácido nucleico que codifica la recombinasa puede recuperarse a continuación por procedimientos conocidos, como por ejemplo electroforesis en gel.

55 El ácido nucleico puede almacenarse (preferentemente a temperaturas inferiores a -80°C) u opcionalmente puede clonarse en la etapa (1) en un vector de expresión para su utilización en un análisis posterior, en procedimientos de expresión de proteínas de administración a un paciente para el tratamiento del SIDA. A continuación se definen los vectores de expresión adecuada.

60 Preferentemente, los recombinasas finalmente obtenidas son sometidas a prueba en células de mamífero para asegurarse de que funcionan en un entorno de células de mamífero. Además, para obtener una buena expresión en células de mamífero puede optimizarse la expresión de las recombinasas en estas células (por ejemplo, optimización de la utilización del codón utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo Shimshek *et al.*, 2002) o secuencias señal necesarias para dirigir la proteína dentro del núcleo de las células de mamífero, como la secuencia NLS (Macara, 2001) pueden añadirse a los ácidos nucleicos de la recombinasa adaptada.

En una forma de realización preferida de la presente invención la recombinasa conocida cuya secuencia diana se utiliza en la etapa (a) y en la que se aplica evolución molecular dirigida en las etapas (g) e (i) pertenece a la familia de serina integrasas. Las recombinasas preferidas pertenecientes a la familia de serina integrasas seleccionadas de entre el grupo constituido por phiC31 integrasa (Combes *et al.*, 2002), cualquier componente de sistemas de recombinación Gin o Hin, Tn3 resolvasa (Krasnow y Cozzarelli, 1983) o cualquier otro miembro de las recombinasas serina grandes, Rag1, Rag2 o cualquier otro componente del sistema de recombinación VDJ o sus variantes.

En otra forma de realización preferida dicha recombinasa pertenece a la familia de las tirosina integrasas. Las recombinasas preferidas pertenecientes a la familia de las tirosina integrasas se seleccionan de entre el grupo constituido por Cre del fago P1 (Abremski *et al.*, 1983, 1984), FLP recombinasa de levadura (Volkert y Broach, 1986), Dre de fago D6 (Sauer y McDermott, 2004), R recombinasa del plásmido pSR1 de *Zygosaccharomyces rouxii*, A recombinasa del plásmido pKD1 de *Kluveromyces drosophilarius*, A recombinasa del plásmido pKW1 de *Kluveromyces waltii*, Tnpl del transposón Tn4430 de Bacillus, cualquier componente del sistema de recombinación λ Int o sus variantes.

Las recombinasas de la familia de integrasa tirosina se caracterizan por tener una tirosina como sitio nucleófilo activo que se utiliza para la escisión de ADN, mientras que recombinasas de la familia de serina integrasa utilizan una serina en lugar de una tirosina.

El término variante en este contexto se refiere a las proteínas que proceden de las proteínas anteriores por eliminación, sustitución y/o adición de aminoácidos y que conservan parte o la totalidad de la función inherente en la proteína de la que proceden.

En una forma de realización preferida, la recombinasa conocida es una recombinasa híbrida obtenida por ejemplo por "mezcla al azar de la familia" descrito por Cramer *et al.* (1998). Los requisitos previos para la utilización de la mezcla al azar de la familia es una significativa homología entre las recombinasas utilizadas para generar las recombinasas híbridas. Un ejemplo de una recombinasa híbrida que puede utilizarse en la presente invención es una recombinasa híbrida que consta de secuencias de recombinasa Cre y recombinasa Dre, respectivamente.

En una forma de realización más preferida la recombinasa es la recombinasa Cre que reconoce un sitio diana simétrico de 34 pb conocido como *loxP*. El sitio *loxP* (y también en otros sitios de recombinación de recombinasas naturales) es palindrómica con dos repeticiones de 13 pb separadas por los ocho pares de bases más internos, que representan al denominado separador, que proporciona direccionalidad al sitio. La recombinación tiene lugar por escisión en la secuencia separadora. Dependiendo de la situación y la orientación relativa de los dos sitios de *loxP*, Cre cataliza la integración, escisión o reestructuración del ADN (Hoess y Abremski, 1985).

Preferentemente la secuencia diana asimétrica identificada en el etapa (a) está situada tanto en 5'-LTR como en 3'-LTR del provirus para permitir la escisión del ADN provirico en el genoma de la célula hospedadora.

Se identificó una secuencia dentro de la secuencia LTR de ADN del VIH provirico con 50% de homología con el sitio *loxP*. Esta secuencia se denomina *loxLTR* (SEC ID nº 1) y pertenece a la LTR de la cepa TZB0003 del VIH-1 primario (Blackard *et al.*, 1999) que forma parte de la región U3 moduladora (posición de la secuencia -262 a -229; en la que el sitio de iniciación de la transcripción es + 1). El sitio *loxltr* es una secuencia asimétrica de 34 pb que tiene 50% de similitud de secuencia con la secuencia del sitio *loxP* con cuatro de los desemparejamientos en el elemento izquierdo, seis en el elemento derecho y un separador completamente diferente (véase la figura 2A).

Utilizando una evolución dirigida relacionada con el sustrato y la secuencia *loxLTR* como sustrato, los presentes inventores han podido producir una recombinasa adaptada que recombina esta secuencia diana asimétrica de ADN presente en una repetición terminal larga del VIH-1. Esta es la primera vez que se generó una sola recombinasa específica de sitio relacionada con Cre que recombina un sitio diana asimétrico. Contrariamente a las recombinasas conocidas en esta materia, la recombinasa de la presente invención reconoce secuencias diana que eran asimétricas y muy alejadas de la secuencia diana original de la nativo Cre recombinasa natural. El desarrollo de recombinasas adaptadas que dirige específicamente secuencias asimétricas dentro de una LTR del VIH-1 permite la escisión de los respectivos provirus desde su sitio de integración cromosómica como se demostró.

Sin embargo, es evidente para el experto en la materia que se pueden generar otras recombinasas adaptadas específicas de sitio que recombinan sitios diana divergentes encontrados el genoma de provirus retrovirico insertado en el genoma de la célula hospedadora. Pueden determinarse secuencias candidatas, por ejemplo, basándose en la homología con la presente secuencia *loxLTR*. Ejemplos de dichas secuencias derivadas de la LTR de otras cepas de VIH con homología con la secuencia *loxLTR* se muestran en la figura 2A.

El ADN provirico insertado en el genoma de una célula hospedadora es preferentemente el ADN de un retrovirus. Los retrovirus comprenden una gran y diversa familia de virus con ARN envuelto. La característica distintiva de la familia es su estrategia multiplicativa que incluye como etapas esenciales la transcripción inversa del ARN vírico en ADN bicatenario lineal y la posterior integración de este ADN (ADN provirico) en el genoma de la célula

hospedadora. Los retrovirus se subdividen en siete grupos, definidos por parentesco evolutivo. Cinco de estos grupos (retrovirus alfa, beta, delta, épsilon y gamma) representan los retrovirus con potencial oncogénico y los otros dos grupos son los lentivirus y la espumavirus. Los virus tipo I y tipo II de la leucemia de linfocitos T humanos patógenos (VLTH-I y VLTH-II) pertenecen al grupo retrovirus delta, mientras que el virus de la inmunodeficiencia humana SIDA tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) pertenecen al grupo lentivirus (para consultas véase el libro de texto general "Retroviruses" de Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. (eds.) 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press Nueva York).

En una forma de realización preferida del ADN provírico insertado en el genoma de una célula hospedadora es el ADN de un retrovirus seleccionado de entre el grupo constituido por el virus de tumor de mama de ratón (VTMR), virus de mono de Mason Pfizer (VMMP), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo I (VLTH-I), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo II (VLTH-II), virus de la leucemia linfocitos T de simio tipo I (VLTS-I), virus de la leucemia de linfocitos T de simio tipo II (VLTS II), virus de la leucemia bovina (VLB), virus de la leucemia felina (VLFe) y virus de la leucemia murina de Moloney (VLMMo).

En una forma de realización más preferida, el retrovirus es un lentivirus seleccionado de entre el grupo constituido por virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), virus de inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), virus Maedi-visna (VMV), virus de la anemia equina infecciosa (VAEI) y virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC).

En una forma de realización más preferida la secuencia diana asimétrica identificada en la etapa (a) del procedimiento de la presente invención está situada tanto en el 5'-LTR como en el 3'-LTR de un VIH provirus. Preferentemente, dicha secuencia diana asimétrica situada tanto en el 5'-LTR como en el 3' LTR de un provirus VIH tiene la secuencia establecida como SEC ID nº 1. Esta secuencia se denomina *loxtr*.

En una forma de realización preferida, el procedimiento de evolución molecular dirigida aplicada en el procedimiento de la presente invención es el procedimiento de la evolución de la proteína unida al sustrato (SLiPE; Buchholz y Stewart, 2001; véase también el documento WO 02/44409).

En el procedimiento de la presente invención el ácido nucleico que codifica por lo menos una recombinasa adaptada activa en la secuencia diana asimétrica dentro de la LTR del ADN retrovírico se clona en un vector de expresión. Los vectores de expresión son montajes genéticos para expresar las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos dentro del vector. Dichos vectores de expresión pueden ser vectores extracromosómicos que se automultiplican o vectores que se integran en el genoma del hospedador. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador de la transcripción y la traducción operativamente unido al ácido nucleico que codifica la recombinasa adaptada de la presente invención.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación operativamente unida en un organismo hospedador específico. Las secuencias de control que son adecuadas para las procariontas incluyen, por ejemplo, un activador, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión al ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar activadores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un activador o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si se coloca para facilitar la traducción. La unión se realiza mediante la ligadura en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se utilizan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional. El ácido nucleico regulador de transcripción y traducción será apropiado generalmente para la célula hospedadora utilizada para expresar la recombinasa adaptada. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiada y secuencias reguladoras adecuadas son conocidos en la técnica para una variedad de células hospedadoras.

El vector de expresión utilizado en la presente invención puede ser un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector de espumavirus o un vector adenovírico. Sin embargo, en una forma de realización preferida el vector de expresión es un vector lentivírico seleccionado de entre el grupo constituido por vectores lentivíricos derivados de VIH-1, VIS, VIF o VAEI. Por ejemplo, Schambach *et al.* (2006) describen vectores lentivíricos.

En las formas de realización preferidas de la presente invención el vector de expresión comprende un activador celular, bacteriano, vírico o híbrido.

En general, en el contexto de la presente invención, el activador puede ser un activador constitutivo o inducible. Además, los activadores pueden ser un activador natural, tal como un activador bacteriano, celular o vírico o un activador híbrido. Los activadores híbrido, que combinan elementos de más de un activador, son conocidos en la técnica y son útiles en la presente invención. Además, el activador utilizado en la presente invención puede ser

también un derivado de un activador natural. Un "derivado" de un activador natural como el utilizado en la presente memoria puede ser una combinación de elementos activos en cis obtenidos a partir de activadores o secuencias de diferente origen o, alternativamente, puede obtenerse por eliminación o mutación de elementos activos en cis dentro de un activador natural específico (Edelman *et al.*, 2000; Alper *et al.*, 2006; Hartenbach y Fussenegger, 2006).

5 En una forma de realización más preferida de la presente invención, el activador constitutivo o su derivado se selecciona o procede de entre el grupo constituido por activadores de citomegalovirus, virus del sarcoma de Rous, retrovirus relacionado con el virus de la leucemia murina, gen de fosfogliceroquinas, virus murino formador de focos en el bazo o factor alfa 1 de alargamiento humano.

10 En otra forma de realización más preferida de la presente invención, el activador inducible o el derivado del mismo se selecciona o procede de entre el grupo constituido por el LTR o derivados del mismo procedentes de lentivirus, espumavirus y retrovirus delta.

15 En el presente contexto, el término "LTR" se refiere tanto a las repeticiones de terminal largo 5' como del 3' del provirus con función de activador (para consultas véase el libro de texto general "Retroviruses" (Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. (eds.) 1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York).

20 Preferentemente el activador inducible o su derivado se selecciona o procede del LTR o de sus derivados procedentes de VIH-1, VIH-2, VMV, VAEI, VAEC, VIS, VIF, VIB, VLTH-I y VLTH-II.

25 Además la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una recombinasa adaptada, en el que dicho procedimiento comprende el procedimiento mencionado anteriormente para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada y la etapa posterior de expresión de la recombinasa adaptada o un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de dicha recombinasa adaptada del ácido nucleico que codifica la recombinasa insertado en el vector de expresión obtenido en el procedimiento mencionado anteriormente para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada en una célula hospedadora adecuada.

30 La expresión del ácido nucleico que codifica la recombinasa adaptada clonado en un vector de expresión según la etapa (1) del procedimiento para la preparación de un vector de expresión que codifica que un recombinasa adaptada puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, sistemas de expresión bacterianos, de insectos o mamíferos. Sin embargo, también pueden emplearse otros sistemas de expresión conocidos en la técnica. Los procedimientos de introducción de ácido nucleico exógeno en hospedadores mamíferos, insectos o bacterianos, así como en otros hospedadores, también son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula hospedadora utilizada. Las técnicas incluyen la transfección mediada por dextrano, la precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, la fusión protoplásmica, la electroporación, la infección vírica, encapsulación de polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos.

40 Se preparan proteínas de fusión por procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión del ácido nucleico que codifica la recombinasa adaptada se clona dentro ya comprende una secuencia nucleico que codifica un segundo polipéptido o proteína. Al clonar el ácido nucleico que codifica la recombinasa adaptada en el marco con la secuencia del segundo polipéptido o proteína, ambas secuencias se expresarán como proteína de fusión.

45 Las células hospedadoras utilizadas para expresar la recombinasa adaptada de los vectores de expresión son preferentemente células hospedadoras, incluidas las células procariotas, tales como por ejemplo las células bacterianas o células de levadura, o células eucariotas, como por ejemplo células de insectos o células de mamíferos.

50 La presente invención proporciona además un procedimiento para preparar una célula madre adulta transformada, según la cual dicho procedimiento comprende el procedimiento mencionado anteriormente para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada y la etapa adicional de introducción del vector de expresión obtenido en el procedimiento mencionado anteriormente para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada *in vitro* en una célula madre adulta adecuada.

55 En otro aspecto la presente invención se refiere a los ácidos nucleicos que pueden obtenerse a partir del procedimiento mencionado de la presente invención.

60 Un "ácido nucleico" como se utiliza en la presente memoria es un compuesto polimérico compuesto de subunidades unidas por enlaces covalentes denominadas nucleótidos. Ácido nucleico incluye ácido polirribonucleico (ARN) y ácido polidesoxi-ribonucleico (ADN), que pueden ser tanto monocatenarios como bicatenarios. El ADN incluye ADNc, ADN genómico, ADN sintético y ADN semisintético.

65 En su aspecto más amplio el ácido nucleico obtenido por el procedimiento de la presente invención es un ácido nucleico que codifica una recombinasa adaptada, según el cual la recombinasa adaptada recombina secuencias

diana asimétricas en el ADN de un provirus insertado en el genoma de una célula hospedadora que conduce a la escisión del provirus del genoma de la célula hospedadora, en el que los sitios diana asimétricos son diferentes de los sitios diana de la recombinasa natural.

5 En una forma de realización el ácido nucleico obtenido por el procedimiento de la presente invención tiene la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEC ID nº 2 y reconoce y recombina la secuencia *loxtr* expuesta como SEC ID nº 1.

10 También se incluyen en la definición de los ácidos nucleicos las variantes de la secuencia de ácido nucleico obtenidas por el procedimiento de la presente invención que tienen por lo menos 50% de similitud, preferentemente por lo menos 60% de similitud, más preferentemente por lo menos 70% similitud, todavía más preferentemente por lo menos 80% de similitud y todavía más preferentemente por lo menos el 90% de similitud con la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEC ID nº 2 En algunas formas de realización la similitud será como máximo 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%.

15 En otro aspecto la presente invención se refiere también al vector de expresión que puede obtenerse por el procedimiento mencionado anteriormente de la presente invención.

20 Otro aspecto de la invención es la proteína recombinasa adaptada que puede obtenerse por el procedimiento mencionado de la presente invención.

El término "proteína" tal como se utiliza en la presente memoria incluye proteínas, polipéptidos y péptidos. Como apreciarán los expertos en la materia, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse para generar secuencias de proteínas.

25 En una forma de realización preferida la proteína recombinasa adaptada tiene la secuencia de aminoácidos presentada como SEC ID nº 3. Esta recombinasa se denominó Tre para la LTR recombinasa.

30 También se incluyen en la forma de realización de las proteínas recombinasa adaptada las variantes de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos presentados como SEC ID nº 3. Preferentemente, las variantes tendrán una similitud de secuencia de por lo menos 70%, más preferentemente una similitud de secuencia de por lo menos 80% similitud y aún más preferentemente una similitud de secuencia de por lo menos el 90% con la secuencia presentada como SEC ID nº 3. En algunas formas de realización la similitud será como máximo 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%. En cuanto a los ácidos nucleicos, la similitud en este contexto significa homología de secuencia o identidad, prefiriéndose identidad. Esta similitud se determinará utilizando técnicas convencionales conocidas en la materia tal como se esbozaron anteriormente para las homologías de ácido nucleico.

40 En una forma de realización más preferida la proteína a recombinasa adaptada también puede prepararse como un polipéptido de fusión, utilizando técnicas bien conocidas en la materia. En una forma de realización preferida la proteína recombinasa adaptada está unida a un segundo polipéptido. Preferentemente el polipéptido de fusión se obtiene por el procedimiento mencionado anteriormente de la presente invención, en el cual la recombinasa adaptada está unida a un segundo polipéptido.

45 Preferentemente, la proteína recombinasa adaptada se prepara como un polipéptido de fusión para aumentar la expresión. En una forma de realización más preferida la proteína recombinasa adaptada se prepara como un polipéptido de fusión para permitir la introducción de polipéptido en células vivas. Por lo general, las proteínas purificadas no pueden penetrar en las células, porque no pueden traspasar la membrana celular debido a su tamaño. Sin embargo, la fusión de secuencias de péptidos específicas a proteínas puede dar como resultado la captación de estas proteínas de fusión en las células. En la célula la proteína puede realizar entonces su función. 50 Las recombinasas específicas de sitio, incluyendo la Cre recombinasa, se han logrado suministrar a las células por este procedimiento (Peitz *et al.*, 2002). Las recombinasas que penetran en las células han sido descritos con mas detalle por Nolden *et al.* (2006) y Lin *et al.* (2004). Por lo tanto, esta estrategia puede utilizarse para suministrar recombinasas en las células para eliminar el provirus de las células infectadas.

55 Por lo tanto, el segundo polipéptido en el polipéptido de fusión puede comprender un péptido señal. El péptido señal puede ser un dominio de transducción de proteínas como el péptido TAT o un péptido de la tercera hélice del homeodominio Antennapedia (Derossi *et al.*, 1994, 1996; Vives *et al.*, 1997; Vives, 2003; Richard *et al.*, 2005) o o la SLN (secuencia de localización del núcleo) para suministrar el polipéptido de fusión en el núcleo de una célula eucariota (Macara, 2001).

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la célula madre adulta como puede obtenerse en el procedimiento mencionado anteriormente para preparar una célula madre adulta transformada de la presente invención. Las células madre se infectan o transfectan preferentemente con el vector de expresión según la invención.

65 En una forma de realización preferida la célula madre adulta es una célula madre del linaje hematopoyético que expresa la recombinasa adaptada, el polipéptido de fusión mencionado anteriormente o que comprende el vector de

expresión mencionado anteriormente.

5 Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células CD34⁺ procedentes de la médula ósea, que pueden purificarse a partir de la sangre periférica de donantes movilizada con G-CSF (por ejemplo, pacientes infectados por VIH) por leucaféresis rutinaria (Scherr y Eder, 2002). Las células genéticamente modificadas *in vitro* se reinfunden a continuación en los pacientes.

10 En la situación de la tecnología, la expresión "células madre" designa las células que (a) tienen la capacidad de autorrenovación y (b) capacidad para formar por lo menos uno y a menudo varios tipos de células especializadas debido a su capacidad de división asimétrica (Donovan y Gearhart, 2001). Las células madre adultas pueden aislarse de diferentes tejidos de adulto, es decir, de individuos diferenciados. Dichas células se denominan en la situación actual de la tecnología "células madre pluripotentes adultas". La diferencia esencial entre las células madre pluripotentes embrionarias y las células madre pluripotentes adultas radica en el número de tejidos diferenciados, que pueden obtenerse de las células respectivas.

15 En una forma de realización más preferida la presente invención se refiere a células CD4⁺ primarias (células sanguíneas) de pacientes infectados por el VIH.

20 En una etapa más del procedimiento de la presente invención el vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un recombinasa adaptada, la proteína recombinasa, la proteína de fusión o las células madre adultas obtenidas por los procedimientos de la presente invención se preparan como una composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en un paciente infectado por un retrovirus.

25 Un asunto adicional de la invención es la composición farmacéutica obtenida por el procedimiento mencionado. La composición farmacéutica está presente preferentemente en forma de una solución adecuada para aplicación intravenosa (infusión).

30 La preparación farmacéutica más podrá comprender además uno o más vehículo(s), excipiente(s) y/o adyuvante(s) farmacéuticamente aceptable(s). Los vehículos, excipientes y adyuvantes adecuados para su utilización en una composición farmacéutica son conocidos en la técnica.

35 La composición farmacéutica de la presente invención reduce la carga del virus en un paciente infectado por un retrovirus por debajo de 5.000 equivalentes de genoma/ml de plasma, preferentemente por debajo de 500 equivalentes de genoma/ml de plasma y más preferentemente por debajo de 50 equivalentes de genoma/ml de plasma cuando se administra al paciente.

40 Así, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada (o la recombinasa adaptada como proteína o polipéptido de fusión o una célula madre que comprende el vector de expresión) puede reducir la carga de virus en un paciente infectado con un retrovirus al erradicar el depósito genético de los retrovirus en el interior de las células hospedadoras, evitando así más ciclos de vida del virus.

45 La expresión "carga de virus" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los equivalentes de ARN de VIH (es decir, genomas) que se asocian con 1 ml de plasma del paciente (Dybul *et al.*, 2002). Por lo tanto, la carga de virus se determina midiendo el contenido de ADN vírico en una muestra extraída del paciente. Actualmente, existen tres tipos principales de ensayos de carga vírica disponibles:

- 50 1) Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa VIH ARN (RT-RCP): Amplicor™ HIV-Monitor Test; Roche Diagnostics
- 2) ADN de cadena ramificada (ADNb): ensayo de ARN del VIH Versant™; Bayer Diagnósticos; y
- 3) Ampliación de ácido nucleico basado en la secuencia (NASBA): Ensayo NucliSens™; bioMérieux.

55 En una forma de realización preferida la composición farmacéutica de la presente invención es capaz de reducir la carga de virus en un paciente infectado por un retrovirus por debajo de 5.000 equivalentes de genoma/ml plasma, preferentemente por debajo de 500 equivalentes de genoma/ml de plasma y más preferentemente por debajo de 50 equivalentes de genoma/ml de plasma. Los pacientes con una carga de virus inferior a 5.000 equivalentes de genoma/ml de plasma se considera que están relativamente bien ajustados al tratamiento medicinal. Sin embargo, el objetivo en la terapia actual del SIDA es una reducción de la carga vírica por debajo del límite de detección de los ensayos de carga de virus, que se encuentra actualmente por debajo de aproximadamente 50 equivalentes de genoma/ml de plasma.

65 En este contexto, los inventores fueron los primeros en demostrar que puede utilizarse una recombinasa adaptada para escindir el ADN provírico completo del genoma de una célula hospedadora de mamífero sin afectar negativamente la viabilidad celular (véase la figura 9). Después del tratamiento de las células infectadas con una

recombinasa adaptada según la presente invención (1) el ADN retrovítico en el genoma del hospedador y (2) las partículas de virus que brotan de células infectadas no resultaban ya detectables, demostrando que el depósito vírico en células en reposo se destruyó.

5 La composición farmacéutica reduce preferentemente la carga vírica de retrovirus seleccionados de entre el grupo constituido por el virus de tumor de mama de ratón (VTMR), virus de mono de Mason Pfizer (VMMP), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo I (VLTH-I), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo II (VLTH-II), virus de la leucemia linfocitos T de simio tipo I (VLTS-I), virus de la leucemia de linfocitos T de simio tipo II (VLTS II), virus de la leucemia bovina (VLB), virus de la leucemia felina (VLF_e) y virus de la leucemia murina de Moloney (VLMMo)

10 Todavía en una forma de realización más preferida el retrovirus que va a tratarse con composición farmacéutica de la presente invención es un lentivirus. Dicho lentivirus preferentemente se selecciona de entre el grupo formado por virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de inmunodeficiencia de simios (VIS), virus de inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), virus Maedi-visna (VMV), virus de anemia infecciosa equina (VAIE) y virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC).

15 Sin embargo, resulta evidente para el experto en la materia, que la presente invención también es aplicable a las infecciones retrovíticas por otros retrovirus aparte de los mencionados anteriormente.

20 Además, el paciente infectado por un retrovirus al que se administra la composición farmacéutica se selecciona de entre el grupo constituido por seres humanos, primates, monos, ganado vacuno, caballos, cabras, ovejas y gatos domésticos. Sin embargo, el paciente es preferentemente un ser humano.

25 En una forma de realización preferida la composición farmacéutica es para administración simultánea con otros agentes activos de la terapia antirretrovítica hiperactiva (TARHA).

30 La terapia antirretrovítica hiperactiva TARHA es una terapia de combinación dirigida a la transcriptasa inversa vírica, proteasa y fusión (Gulick *et al.*, 1997; Lalezari *et al.* 2003).

En otra forma de realización preferida la composición farmacéutica es para administración simultánea o posterior a la terapia de inmunoactivación global o activación específica de la expresión génica de provirus.

35 La premisa de la terapia de inmunoactivación se basa en la hipótesis de que activación deliberada de las células infectadas por el VIH latentemente puede acelerar la erradicación de depósitos víricos persistentes. La erradicación se produciría a través de la eliminación inmune por muerte programada de las células que expresan activamente VIH-1 productos (pro-apoptóticos) (Kulkosky y Bray, 2006). La inmunoactivación global (activación de inmunocitos, incluidas las células en reposo) generalmente se consigue mediante, por ejemplo, mediante la administración de inmunotoxinas, citocinas (por ejemplo, IL-2) o anticuerpos que activan linfocitos T (por ejemplo, OKT3).

40 En vista del hecho de que la inmunoactivación condujo deliberadamente a activar depósitos latentes resistentes a TARHA lamentablemente no pudieron eliminar permanentemente el VIH-1 y el rebote vírico (para consultas, véase Kulkosky y Bray 2006; Marcello, 2006; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2005) debido al hecho de que la activación global de linfocitos T aparentemente también ocasiona la replicación vírica y aumenta el número de células diana potenciales con VIH-1 más allá del nivel que puede contener TARHA (Fraser *et al.*, 2000) son necesarios más tratamientos específicos para tratar el VIH. Una estrategia es la activación de la transcripción de genomas víricos por otro lado latentes. La activación específica de la expresión génica del provirus latente puede conseguirse mediante la administración del éster de forbol Prostratina o la citocina humana IL-7, que parecen reactivar el VIH-1 latente en ausencia de proliferación celular (Marcello, 2006). Además, la activación de la transcripción selectiva del VIH también puede conseguirse mediante inhibidores de la histona-desacetilasa (HDAC1) tales como, por ejemplo, el ácido valproico, que eventualmente produce excrecencias de VIH-1 de las células en reposo en ausencia de activación celular (Marcello, 2006; Lehrman *et al.*, 2005).

50 Sin embargo, la terapia de inmunoactivación global o la activación específica de expresión génica de provirus o estrategias terapéuticas similares se benefician en gran medida de la eliminación simultánea del ADN provírico, reduciendo de este modo en el paciente la mezcla de células infectadas.

55 En otro aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para optimizar el tratamiento de una infección retrovítica de un paciente.

60 Este procedimiento comprende las etapas siguientes:

(a) determinar la secuencia del ácido nucleico de ADN retrovítico presente en una muestra de sangre de un paciente;

65 (b) exploración de la secuencia de LTR de la secuencia de la etapa (a) para secuencias de recombinación conocidas

para las que específicamente ya se han preparado recombinasas adaptadas;

(c) en el caso de que exista por lo menos una de dichas secuencias de recombinación conocidas, entonces un compuesto seleccionado de entre el grupo formado por un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la recombinasa adaptada reconoce específicamente dicha secuencia de recombinación conocida, dicha recombinasa adaptada, una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de dicha recombinasa adaptada o una célula madre adulta se prepara dicho vector de expresión como composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en el paciente; de lo contrario las secuencias con homología de por lo menos el 30% de las secuencias del hemisitio izquierdo y del hemisitio derecho de sitios diana conocidos de un recombinasa, en las que las secuencias homólogas están separadas por un separador adecuado de 5 a 12 nucleótidos, se identifican y se denominan "secuencia diana asimétrica";

(d) realizar las etapas (b) a (l) del procedimiento mencionado anteriormente para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada que recombina específicamente la secuencia diana asimétrica identificada dentro de la LTR del ADN provírico; y

(e) preparar el vector de expresión obtenido en la etapa (d), una proteína o una proteína de fusión expresada en dicho vector de expresión o una célula madre transfectada o infectada con dicho vector de expresión como una composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en el paciente.

En este procedimiento está prevista un recombinasa adaptada para su utilización en el tratamiento de un paciente que padece una infección retroviral que está específicamente adaptada para recombinar secuencias diana específicas de retrovirus, con que el paciente está infectado. En vista de las variedades de secuencia que se encuentran dentro de las secuencias LTR de varios retrovirus una recombinasa adaptada para recombinar una secuencia diana asimétrica específica de un retrovirus específico no reconocerá necesariamente las secuencias diana en el ADN provírico de otros retrovirus y así será menos o incluso ineficaz en la escisión de otros ADN províricos que a los que se adaptó. Sin embargo, para abordar este problema y proporcionar recombinasas individualmente adaptadas para tratar la infección retroviral básicamente de cada paciente, está previsto un procedimiento *in vitro* que permite la optimización de la eficacia de una recombinasa para ser administrada seleccionando o adaptando una recombinasa que reconocerá específicamente una secuencia diana en el genoma provírico individual con el que está infectado un paciente.

En la etapa (a) del procedimiento *in vitro* de la invención de optimización del tratamiento de una infección retroviral se determina la secuencia de ácido nucleico del ADN retroviral presente en una muestra de sangre de un paciente. En esta primera etapa el retrovirus con el que el paciente está infectado se determina preferentemente por la secuenciación del ADN utilizando inhibidores de terminación de la cadena (Sanger *et al.*, 1977) del genoma de las partículas víricas dentro de la muestra de sangre obtenida de la paciente. También pueden utilizarse otros medios bien conocidos por los expertos en la materia que proporcionan información sobre la secuencia del retrovirus.

En la etapa (b) el procedimiento *in vitro* en la secuencia de LTR obtenida en la etapa (a) se exploran las secuencias de recombinación conocidas para las que ya se han preparado recombinasas específicamente adaptadas. Esta búsqueda se realiza utilizando por ejemplo, el análisis de la secuencia por ordenador como se describió anteriormente.

Si la LTR de las partículas de virus encontrados en la muestra de sangre comprenden por lo menos una secuencia correspondiente a una secuencia diana asimétrica conocida para la que ya existe una recombinasa adaptada, entonces un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la recombinasa adaptada que reconoce específicamente dicho sitio de recombinación conocida, dicha recombinasa adaptada, una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de dicha recombinasa adaptada o una célula madre adulta transfectada o infectada con el vector de expresión definido anteriormente se prepara como una composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en el paciente. Esto permite un tratamiento rápido e individual de la infección retroviral específica con un recombinasa eficaz.

Sin embargo, si dicha recombinasa adaptada no se ha preparado antes, en la etapa (c) la secuencia de la LTR de las partículas de virus encontradas en la muestra de sangre se utiliza para identificar secuencias en éstas con homología de por lo menos el 30% de las secuencias del hemisitio izquierdo y del hemisitio derecho de sitios diana conocidos de una recombinasa, en la que las secuencias homólogas están separadas por un separador de 5 a 12 nucleótidos. Como anteriormente, dichas secuencias homólogas se denominan "secuencia diana asimétrica". La descripción detallada proporcionada anteriormente por la etapa (a) del procedimiento para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada es asimismo aplicada.

En la etapa (d) del procedimiento *in vitro*, se llevan a cabo las etapas (b) a la (l) del procedimiento de preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada descrito anteriormente para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada que recombina específicamente una secuencia diana asimétrica identificada dentro de la LTR del retrovirus que se encuentra en la muestra de sangre. Esto permite la preparación de una nueva recombinasa que recombina el ADN provírico del retrovirus que padece el paciente dentro

de muy poco tiempo.

La descripción detallada descrita anteriormente para las etapas (b) a (l) del procedimiento para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada también se aplica aquí.

5 Por último, en la etapa (e) del procedimiento *in vitro* el vector de expresión obtenido que codifica un recombinasa que reconoce y recombina específicamente el ADN provírico del retrovirus con el que está infectado el paciente se prepara como una composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en dicho paciente. En este contexto, en otra forma de realización la composición farmacéutica preferentemente puede comprender cada
10 recombinasa adaptada como una proteína o una proteína de fusión expresada desde el vector de expresión o una célula madre transfectada o infectada dicho vector de expresión. En una forma de realización más preferida la composición farmacéutica comprende un vector de expresión que contiene ácidos nucleicos que codifica cada recombinasa adaptada.

15 La recombinasa a la que se aplica el procedimiento de evolución molecular dirigida en el procedimiento *in vitro* anteriormente descrito se selecciona de entre una recombinasa natural o una recombinasa ya adaptada. Sin embargo, la recombinasa preferentemente es una recombinasa adaptada (que reconoce una secuencia diana asimétrica ligeramente diferente a las que se encuentran en la LTR del ADN provírico presente). La elección depende de la homología de las secuencias diana asimétricas. Aunque puede aplicarse evolución molecular dirigida
20 a un recombinasa (natural o adaptada) que reconoce una secuencia diana con poca homología con la secuencia dentro de la LTR del ADN provírico, esto requerirá ciclos de evolución adicionales para obtener una recombinasa específicamente adaptada y de este modo empleará más tiempo. Como es más probable que unas recombinasas adaptadas existentes reconozcan una secuencia diana asimétrica que tiene estrecha homología de secuencia con las secuencias en la LTR, la evolución molecular dirigida se aplica preferentemente a dichas recombinasas adaptadas.
25 Diferencias más pequeñas dentro de las secuencias diana necesitan menos ciclos de evolución para "cambiar" la especificidad de la recombinasa (previamente adaptada para reconocer una secuencia diana diferente) a la secuencia diana dentro de la LTR, ahorrando así tiempo y permitiendo un tratamiento más rápido de la infección retroviral.

30 En una forma de realización preferida del procedimiento *in vitro* la eficacia de ambas recombinasas adaptadas ya existentes identificadas en la etapa (c) de la recombinasa *in vitro* o la adaptada específicamente en la etapa (d) opcionalmente se prueba *in vitro* con respecto a la escisión del ADN provírico del retrovirus, con que el paciente está infectado. Esta prueba se realiza antes para preparar dichas recombinasas como composición farmacéutica.

35 Se realizan pruebas de la eficacia de las recombinasas para asegurar que la respectiva recombinasa reconoce y recombina la secuencia diana asimétrica específica también en células de mamíferos. Esta prueba se realiza preferentemente en células de mamífero como células HeLa, células PMI, linfocitos T de Jurkat, linfocitos T CEM y monocitos de la sangre periférica (PMNC).

40 En otra etapa opcional del procedimiento *in vitro* de optimización del tratamiento de una infección retroviral de un paciente de la recombinasa adaptada que finalmente obtenida está incluida en un conjunto de recombinasas específicamente adaptadas. Esta etapa permite la construcción de un conjunto de diferentes recombinasas adaptadas que cada una reconoce secuencias diana específicas diferentes a las de las demás. El creciente número de recombinasas adaptadas dentro de este conjunto aumenta la probabilidad de que una recombinasa adaptada
45 esté disponible que reconoce una secuencia diana íntimamente relacionada con secuencias dentro de la secuencia LTR de ADN provírico se necesita una recombinasa. De este modo, con un número creciente de recombinasas en el conjunto disminuye la probabilidad de que una recombinasa natural tenga que adaptarse en un procedimiento que utiliza más tiempo, mientras es posible que aumente la probabilidad de la generación más rápida (es decir, que requiere menos ciclos de evolución) de un recombinasa específicamente adaptada a partir de otra recombinasa adaptada más estrechamente relacionada.
50

En un último aspecto la presente invención se refiere a un conjunto de recombinasas adaptadas, en la que los miembros de dicho un conjunto se obtuvieron por los procedimientos de la presente invención.

55 En consecuencia, el conjunto de recombinasas adaptadas de la presente invención comprende preferentemente vectores de expresión que codifican recombinasas adaptadas, bacterias que comprenden vectores que contienen un ácido nucleico que codifica una recombinasa adaptada, recombinasas adaptadas en forma de proteína o vectores víricos que comprenden el ácido nucleico que codifica recombinasas adaptadas preparadas según las buenas prácticas de fabricación.
60

En una forma de realización preferida el conjunto de la presente invención comprende vectores de expresión que codifican ácidos nucleicos que codifican recombinasas específicamente adaptadas. Los vectores de expresión se liofilizan entonces o se almacenarán a temperaturas de por lo menos -70°C. El almacenamiento de bacterias, proteínas o vectores víricos se lleva a cabo por procedimientos bien conocidos en la técnica.
65

Resulta evidente para el experto en la materia que los procedimientos de la presente invención descritos

anteriormente comprenden procesos cíclicos, y aspectos de cada ciclo o todo el ciclo es susceptible de automatización.

Breve descripción de las figuras

5
 10
 15
 Figura 1. Estrategia de división de secuencias diana asimétricas. Las flechas sombreadas en gris representan las repeticiones invertidas de un sitio diana simétrico separadas por una secuencia separadora (barra negra). Los números y letras en el sitio diana asimétrico representan nucleótidos que se desvían del sitio diana simétrico homólogo. Las flechas curvas representan la generación de repeticiones invertidas sobre la base de una secuencia de hemisitio y una secuencia separadora. Las casillas sombreadas en gris en el sitio diana en los segundo y tercer subconjunto representan nucleótidos del sitio diana simétrica homóloga reemplazando un nucleótido que se desvía. La secuencia separadora en las secuencias diana de los subconjuntos diferentes puede ser diferente de la de la secuencia diana homóloga (y se representa así con rayas negras sobre fondo blanco). El gráfico sólo ilustra la sustitución de nucleótidos. Las sustituciones de otros nucleótidos y de diferentes números y de diferentes números son igualmente posibles y preferidas. Abreviaturas: hsl = secuencia de hemisitio 1; hs2 = secuencia de hemisitio 2, hs1' = repetición invertida generada a partir de secuencia de hemisitio 1; hs2' = repetición invertida generada a partir de secuencia de hemisitio 2;

20
 25
 30
 Figura 2. Estrategia combinatoria de evolución dirigida. (A) Se representan los sitios diana de recombinasa utilizadas durante el proceso de evolución relacionado con el sustrato combinatorio. Las bases resaltadas en gris representan las diferentes de loxP (SEC ID nº 35). Las secuencias loxLTR izquierda y derecha de 13 pb se utilizaron para formar los subconjuntos palindrómicos de 34 pb loxltrl y loxltr2, respectivamente. loxltrs1a y 1b proceden de loxltr1 y se caracterizan por dos mutaciones de hemisitio, correspondiente cada una a los brazos palindrómicos. loxltrs2a y 2b proceden de loxltr2 y se caracterizan por tres mutaciones de hemisitio, cada una. (B) Se muestra un resumen de los ciclos de evolución dirigida relacionados con el sustrato 126 para obtener la recombinasa Tre. Se muestra el número de ciclos de evolución de cada subconjunto loxltr dentro de las flechas con el número de ciclo final en la punta de flecha. La actividad del banco de recombinasa del primer y el último ciclo de los sitios diana se muestra como análisis de restricción del ADN plásmido debajo de las dianas respectivas (digestión de BsrGI/XbaI en una inducción de L-arabinosa de 200 µg/ml). La no recombinada (banda superior de 4,9 kb) y la recombinada (banda inferior de 4,2 kb) se indican como una línea con dos triángulos o un triángulo, respectivamente.

35
 40
 Figura 3. Se muestra una representación de la estrategia de evolución dirigida utilizada para evolucionar recombinasas específicas para loxltr. Los vectores de evolución pEVO-loxltrs se basan en el vector pBAD33 y contienen dos sitios diana de recombinasa directamente repetidos (loxltrs). La recombinación en las loxltrs condujo a la eliminación de la región de intervención que contiene una única secuencia de restricción NdeI y candidatas logradas se pueden recuperar utilizando RCP con cebadores P1 (SEC ID nº 19) y P2 (SEC ID nº 20) tras digestión con NdeI. Los resultados de la RCP en una banda de 1,7 Kb que puede utilizarse para volver a subclonar recombinasas con éxito en el vector de partida para el ciclo siguiente. La digestión de restricción de la mezcla del plásmido con NdeI garantiza la eliminación de los plásmidos no recombinados (no representado en la figura) y por consiguiente elimina las recombinasas no funcionales.

45
 Figura 4. Cartografía de mutaciones de recombinasas evolucionadas en estructura de Cre secundaria. Los aspectos de las mutaciones se muestran en el código de color indicado. Las mutaciones de aminoácidos que aparecen más de una vez se agregan a la barra. Los elementos estructurales de Cre se muestran como barras de hélices α (A a N) y flechas para hojas β (1 a 5) basándose en la estructura cristalina de recombinasa Cre. La tirosina catalítica está indicada por "Y". Los triángulos rellenos marcan aminoácidos haciendo contactos específicos con ADN. Los codones hipervariables están indicados por la posición del aminoácido encima de las barras.

50
 Figura 5. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la recombinasa Tre (SEC ID nº 3). La secuencia NLS, añadida para la localización nuclear de Tre en células de mamíferos está subrayada. Las mutaciones resaltadas en gris claro y gris oscuro (AA 131, 244, 245, 259 y 262) representan el contacto de ADN y restos sin contacto basados en la estructura cristalina de Cre, respectivamente. El número de aminoácidos correspondiente a la secuencia de Cre y el análisis de la mutación presentado en la figura 3 se muestra encima de la mutación.

55
 Figura 6. Comparación de la secuencia loxltr con otras secuencias LTR del VIH-1. Una selección al azar de 27 secuencias LTR de VIH-1 se alineó con la secuencia loxltr de 34 pb y se calcularon las similitudes. Los resultados se muestran como porcentaje de homología de secuencia loxLTR frente a todas las respectivas LTR en el banco. Los números de registro de las secuencias LTR del VIH-1 se muestran en abscisas.

60
 65
 Figura 7. Actividad de recombinasa Tre en *E. coli*. (A) Representación esquemática de ensayo con indicador a base de LacZ. La recombinación específica de sitio conduce a la eliminación del activador de *E. coli*, dando como resultado en el desprendimiento de la expresión de LacZ. (B) Especificidad de recombinación de Tre ilustrada utilizando plásmidos de escisión indicadores a base de lacZ. Se indican las diferentes combinaciones de plásmidos indicadores y recombinasas a base de loxP o loxltr utilizados. Se producen colonias blancas como consecuencia de la eliminación del activador que conduce la expresión de lacZ después de la recombinación. (C) Actividad de recombinasa Tre en diferentes secuencias diana después del cultivo durante la noche a la concentración de 50

µg/ml de ADN plásmido en L-arabinosa correspondiente a las versiones en pEVO de diferentes sitios diana y Tre y digestión con *BsrGI* y *XbaI*. La banda inferior recombinada de 4,2 Kb está indicada como una línea con un triángulo y la banda superior no recombinada como una línea con 2 triángulos. El porcentaje calculado del plásmido recombinado de cada diana se muestra debajo de las bandas.

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35

Figura 8. Ensayo de actividad temporal de recombinasa en células HeLa. (A) Las células HeLa se cotransfectaron con recombinasa y plásmidos indicadores indicados (véase la figura 6). Las células se fijaron y tiñeron con X-gal 48 horas después de la transfección. La recombinación elimina una región que interviene en la terminación y produce la activación de la expresión de lacZ reflejada por células azules. (B) Medición de la actividad de β-galactosidasa en lisados celulares de células HeLa cotransfectadas con recombinasa y plásmidos indicadores indicados. La actividad de β-galactosidasa se presenta como porcentaje de la actividad enzimática de las células después de transfección en paralelo con las formas recombinadas los plásmidos indicadores pSVΔpaX y pSVΔloxtr. (C) Recombinación mediada por Tre en una estirpe de células indicadoras HeLa con loxtr estable. Se simuló que se transfectaba la estirpe celular, se midió la actividad de los vectores de expresión Cre y Tre y de β-galactosidasa en lisados celulares 48 horas después de la transfección. (D) Detección por RCP de la recombinación en la estirpe celular loxtr descrita en (C) después de la transfección con vectores de expresión Cre y Tre. Se muestran los productos de la RCP para el plásmido de control no recombinado y recombinado (pSVloxtr y pSVΔloxtr) y después de transfección con vectores de expresión Cre y Tre. La banda inferior recombinada se indica con una línea con un triángulo y la banda no recombinada superior con una línea con dos triángulos. Se indica la duración de los productos de la RCP.

Figura 9. Ensayo de transactivación Tat de VIH-1 en células HeLa. (A) Diagrama esquemático del vector indicador pVIH/T2/LUC que contiene la secuencia loxtr (indicada por un triángulo blanco) dentro de la región U3 de la HXB3 LTR del VIH-1. Otra copia de la secuencia loxtr, que falta en el vector de control pVIH/T1/LUC, está situada en 3' del gen de luciferasa. El activador de LTR codifica en su región R la región TAR sensible a Tat. La transactivación Tat se refleja en el aumento de expresión de luciferasa de luciérnaga. L1 y L2 indican el par cebador utilizado para la detección por RCP de la recombinación (triángulos negros). La recombinación a través de los sitios loxtr eliminará la región de codificación de luciferasa. (B) Actividad relativa de LTR de VIH-1 después de la transfección de células HeLa con el vector de control pVIH/T1/LUC en presencia y en ausencia de Tre. La actividad de la luciferasa de luciérnaga se midió en los lisados de células transfectadas respectivos 48 horas después de la transfección. Se corrigió la eficacia de la transfección en las actividades utilizando un vector LacZ como control interno y midiendo la actividad de β-galactosidasa en los lisados celulares. (C) Actividad relativa de LTR de VIH-1 después de transfectar las células HeLa con el vector pVIH/T2/LUC en presencia y en ausencia de Tre. Los lisados celulares se analizaron como anteriormente. (D) Detección por RCP de la recombinación mediada por Tre en células HeLa temporalmente cotransfectadas con plásmidos de expresión Tat y los vectores indicados. La banda inferior de 756 pb representa el fragmento recombinado tras la pérdida de la región de codificación de luciferasa y sólo es detectable en células transfectadas con pVIH/T2/LUC y vector de expresión Tre.

Figura 10. Recombinación mediada por Tre de ADN provírico de VIH-1. (A) Diagrama esquemático del provirus NLT2ΔenvPuro. Se representa la secuencia loxLTR situada en el 5' y 3' de LTR. La secuencia separadora está subrayada. La región de codificación nef se sustituye por el gen de resistencia a puromicina (casilla gris claro), y las secuencias específicas de env se eliminan (Δ). Se utilizaron pseudotipos VSV-G respectivos para infectar las células HeLa. (B) Detección de provirus integrado (gag de VIH-1; diagrama superior) y la recombinación de los 5' y 3' de la región LTR (5' y 3'LTR; diagrama inferior) por RCP cuantitativa en tiempo real de ADN genómico completo aislado de las células infectadas y que expresan Tre (Tre) o con Tre insuficiente (referencia) las semanas 4, 6, 8 y 10 después de la transfección. Cada muestra se examinó por triplicado. (C) Análisis de liberación de partículas de virus y viabilidades celulares. Las concentraciones de p24Gag en antígenos en los sobrenadantes de cultivo se determinaron por ELISA (diagrama superior) en las semanas indicadas después de la transfección. Se muestra el porcentaje de inhibición de la replicación vírica dentro del cultivo que expresa Tre, en comparación con las células de referencia. Se hizo el seguimiento simultáneamente de las viabilidades celulares por ensayo alamarBlue (diagrama inferior). (D) Detección de las células que expresan Gag (etiqueta gris claro) por inmunofluorescencia indirecta en el cultivo de referencia (Referencia) la semana 4 o en el cultivo que expresa Tre las semanas 4, 6, 8 y 12 después de la transfección. La incubación de las células de referencia con anticuerpo secundario acoplado a Cy2 solo sirvió como referencia de tinción negativa (NC). Los núcleos se observaron por tinción con DRAQ5 (etiqueta oscura).

Figura 11. Las células que expresan Tre son sensibles a la puromicina. Células de la semana 8 después de la transfección del cultivo insuficiente en Tre (Referencia) o que expresa Tre (Tre) se expusieron a 0,5 µg/ml de puromicina y se hizo seguimiento de viabilidad celular a lo largo del tiempo mediante el ensayo alamarBlue.

La presente invención se explicará con mayor detalle mediante ejemplos.

Ejemplo 1

Expresión de recombinasa y plásmidos indicadores

Se generaron varios vectores de expresión para la presente invención utilizando procedimientos convencionales y

oligonucleótidos sintéticos bicatenarios o tecnología RCP.

Se clonaron los ADNc de Cre y Tre en el vector pIRESneo3 (Clontech) utilizando los sitios de restricción *NheI* y *BamHI* para la expresión en células de mamíferos.

El vectores indicadores multihost pSVpaX y pSVloxtr son idénticos excepto los sitios *loxP* o *loxLTR* directamente repetidos que flanquean la región pac, respectivamente. pSVpaX se ha descrito anteriormente (Buchholz *et al.*, 1996). pSVloxtr se generó a partir de pSVpaX sustituyendo los sitios *loxP* con secuencias *loxLTR*.

Se construyó el plásmido pVIH/T1/LUC del gen indicador sensible a Tat ligando la HXB3 LTR del VIH-1 entre los sitios *SpeI* y *HindIII*, y el gen de luciferasa de luciérnaga entre los sitios *HindIII* y *XhoI* del vector pADNc3 de expresión eucariótica (Invitrogen). Posteriormente, la secuencia *loxLTR* de la cepa TZB0003 del VIH primario (número de registro AF096641 del GenBank) se introducido en el LTR HXB3 por RCP. El plásmido pVIH/T2/LUC se obtuvo por inserción de un oligonucleótido 3' que codifica *loxLTR* bicatenario del gen luciferasa entre los sitios *XhoI* y *ApaI* de pVIH/T1/LUC. El vector pcTat que expresa por Tat el VIH-1, el vector original pBC12/CMV y el vector de control interno pBC12/CMV/ β Gal se han descrito anteriormente (Malim *et al.*, 1988; Ruhl *et al.*, 1993). El vector p3Tre se generó ligando el ADNc de Tre (SEC ID nº 2) entre los sitios *HindIII* y *BamHI* de pADNc3. El plásmido pNLT2 Δ envPuro es un derivado del ADN provírico pNL4-3 (número de registro M19921 en GenBank) y se construyó convirtiendo las respectivas secuencias LTR NL4-3 por RCP en la secuencia *loxLTR* de TZB0003 de VIH-1. Posteriormente, se eliminó un fragmento de 537 pb en el gen *env* (posiciones 6712 a 7249 de nucleótidos). Por último, la secuencia de codificación *nef* se sustituyó por el gen de resistencia a la puromicina. El vector que expresa la glucoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular, pCMV-VSV-G, se ha descrito (Beyer *et al.*, 2002).

Ejemplo 2

Generación de una recombinasa adaptada que reconoce y recombina una secuencia diana asimétrica dentro de la LTR de VIH-1

I. Determinación de secuencias diana asimétricas experimentales

Para empezar el proceso de evolución de las secuencias LTR del VIH-1 se exploró en primer lugar una secuencia con similitud al sitio *loxP* canónico. La secuencia elegida pertenece a la LTR de la cepa TZB0003 del VIH-1 primario (Blackard *et al.*, 1999) y forma parte de su región U3 moduladora (posiciones -262 a -229 de la secuencia; en la que el sitio de iniciación de la transcripción es + 1). El sitio *loxLTR* seleccionada es una secuencia asimétrica de 34 pb que tiene 50% de similitud de secuencia con *loxP* con cuatro incompatibilidades en el elemento izquierdo, seis en el elemento derecho y un separador completamente diferente (véase la figura 2A).

II. Examen de la secuencia *loxLTR* en la evolución de proteínas dirigidas unidas al sustrato en *E. coli*.

Se examinó la secuencia *loxLTR* en la evolución de proteínas dirigidas unidas al sustrato como se describe (Buchholz y Stewart, 2001) (véase también la figura 3).

Se generaron por RCP 690 fragmentos de pares de bases que contienen un sitio de restricción *NdeI* flanqueada por sitios *loxLTR* utilizando los siguientes oligonucleótidos utilizando el plásmido pEVO-*loxP* (Buchholz y Stewart, 2001) como plantilla:

Secuencias de cebador para *loxLTR*:

5'-ATGAGATCTACAACATCCTATTACACCCTATATGCCAACATGGAAGCTTGCATGCCTGCAGATCGAG-3' (SEC ID nº 4) y 5'-TTGAGATCTACAACATCCTATATGCCAACATGGTTCGAACTGTACCGGTTG-TTAGTGA-3' (SEC ID nº 5)

Secuencias de cebador para *loxLTR1*:

5'-ATGAGATCTACAACATCCTATTACACCCTAAATAGGATGTTGTAAGCTTGCATGCCTGCAGATCGAG-3' (SEC ID nº 6) y 5'-TTGAGATCTACAACATCCTATTACACCCTAAATAGGATGTTGTTTCGAACTGTACCGGTTGTTAGTGA-3' (SEC ID nº 7)

Secuencias de cebador para *loxLTR2*:

5'-ATGAGATCTCCATGTTGGCATAACACCCTATATGCCAACATGGAAGCTTGCATGCCTGCAGATCGAG-3' (SEC ID nº 8) y 5'-TTGAGATCTCCATGTTGGCATAACACCCTATATGCCAACATGGTTCGAACTGTACCGGTTGTTAGTGA-3' (SEC ID nº 9)

Secuencias de cebador para *loxLTR1a*:

5 5'-ATGAGATCTACAACATCGTATAACACCCTATATACGATGTTGTAAGCTTGCATGCCTGCAGATCGAG-3' (SEC ID nº 10) y 5'-TTGAGATCTACAACATCGTATAACACCCTATATACGATGTTGTTTCGAACTGTACCGGTTGTTAGTG A-3' (SEC ID nº 11)

Secuencias de cebador para *loxLTR1b*:

10 5'-ATGAGATCTATAACTTCCTATTACACCCTAAATAGGAAGTTATAAGCTTGCATGCCTGCAGATCGAG-3' (SEC ID nº 12) y 5'-TTGAGATCTATAACTTCCTATTACACCCTAAATAGGAAGTTATTTCGAACTGTACCGGTTGTTAGTG A-3' (SEC ID nº 13)

Secuencias de cebador para *loxLTR2a*:

15 5'-ATGAGATCTCCATCTTCGTATAACACCCTATATACGAAGATGGAAGCTTGCATGCCTGCAGATCGAG-3' (SEC ID nº 14) y 5'-TTGAGATCTCCATCTTCGTATAACACCCTATATACGAAGATGGTCGAACTGTACCGGTTGTTAGTG A-3' (SEC ID nº 15)

Secuencias de cebador para *loxLTR2b*:

20 5'-ATGAGATCTATAAGTTGGCATAACACCCTATATGCCAACTTATAAGCTTGCATGCCTGCAGATCGAG-3' (SEC ID nº 16) y 5'-TTGAGATCTATAAGTTGGCATAACACCCTATATGCCAACTTATTTCGAACTGTACCGGTTGTTAGTG A-3' (SEC ID nº 17)

25 Se digirieron fragmentos de RCP con *Bgl*II y se clonaron en el vector de evolución digerido con la misma enzima. Clones Se validaron para la secuencia correcta usando el cebador 5'-CAATAACCCTGATAAATG-3' (SEC ID nº 18) por secuenciación.

30 A partir de bancos de recombinasas clonados en la evolución se generaron vectores pEVO-*loxLTR* por RCP propensa error como se describe en Buchholz y Stewart (2001). El vector de la evolución se basa en el vector pBAD33 (Guzman *et al.*, 1995) y contiene dos sitios diana de recombinasa directamente repetidos (*loxtrs*). El plásmido contiene también el activador araC que permite la expresión de las recombinasas inducible por arabinosa y un marcador de de resistencia a cloranfenicol (Cm) para la propagación en *E. coli*. El plásmido también ofrece la clonación conveniente de las recombinasas utilizando los sitios *Bsr*GI y *Xba*I que flanquean región de codificación de la recombinasa. Se transfirieron los bancos a células DH5 α de *E. coli* y se cultivaron en cultivo líquido LB que contiene cloranfenicol a una concentración de 25 μ g/ml. Se probó la actividad de recombinación en los bancos utilizando el vector de la evolución (véase la figura 3) y Cre un archivo de Cre mutagenizado como se describe (Buchholz y Stewart, 2001).

40 La recombinación y posterior RCP produciría una banda de 1,7 kb que refleja recombinación (véase la figura 3). Sin embargo, Cre, así como el banco no pudo recombinar los sitios *loxLTR* y no se obtuvo producto de la RCP (datos no representados), lo que refleja que la asimetría y las mutaciones en *loxLTR* son demasiado graves para producir recombinación.

45 III. Preparación de subconjuntos de la secuencia diana asimétrica *loxLTR*

50 Para comprobar si la eliminación de la asimetría del sitio diana produciría actividad de recombinación, la secuencia *loxLTR* original se dividió en dos subconjuntos. Se crearon los sitios diana palindrómicos, *loxltr1* y *loxltr2* basándose en la secuencia *loxLTR* asimétrica original, con las secuencias del hemisio izquierdo y derecho utilizadas respectivamente para formar una repetición invertida (véase la figura 2A). Sin embargo, cuando se probó la recombinación en *loxLTR1* y *loxLTR2* utilizando Cre o el banco, no se observó recombinación (datos no representados). Por lo tanto, las mutaciones en estos sitios resultaban todavía excesivas para que el banco de partida presente alguna actividad, y esto obligó a la división adicional de *loxLTR1* y *loxLTR2* al dividir uniformemente las mutaciones de hemisio para formar cuatro nuevos subconjuntos, denominados *loxLTR1a*, *loxLTR1b*, *loxLTR2a* y *loxLTR2b* (véase la figura 2A).

IV. Realizar la evolución de proteínas unidas al sustrato utilizando los subconjuntos de la secuencia diana asimétrica *loxLTR*

60 A partir de bancos de recombinasas clonados en los vectores de evolución pEVO-*loxltr1a*, pEVO-*loxltr1b*, pEVO-*loxltr2a* y pEVO-*loxltr2b* se generaron como se describió anteriormente (véase el ejemplo 2.II) y se transfirieron independientemente en células DH5 α de *E. coli* cultivadas en cultivo líquido LB que contiene cloranfenicol a una concentración de 25 μ g/ml.

65 Los bancos de recombinasa al comienzo de los ciclos de evolución (ciclo 1) se indujeron con 200 μ g/ml de L-arabinosa y la concentración de arabinosa se redujo durante los sucesivos ciclos hasta que se consiguió la

recombinación satisfactoria fue lograda a una inducción mínima (0-5 µg/ml) de L-arabinosa.

El ADN plásmido aislado después de cada ciclo de evolución se digirió con *NdeI* y secuencias de codificación de recombinasa habían logrado recombinar el vector de evolución fueron ampliados con cebadores P1 (5'-TCTACTGTTTCTCCATA-3'; SEC ID nº 19) y P2 (5'-TGTCGCCCTTATTCCCT-3'; SEC ID nº 20) en 50 µl de una mezcla de RCP que contenía 1x tampón de RCP, 250 µM de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ y 1,5 unidades de BioTaq ADN polimerasa según el programa siguiente: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 60 s; hibridación a 55°C durante 60 s y alargamiento a 72°C durante 90 s. El producto de la RCP de la forma recombinada del plásmido produce una banda de 1,7 kb. Este producto de la RCP se digirió con *BsrGI* y *XbaI* y se volvió a subclonar en los vectores pEVO-LTR apropiados para el próximo ciclo de evolución. El banco se mantuvo por encima de 25.000 clones individuales para todos los bancos.

CRE recombinó sólo *loxItr1a* a concentraciones muy bajas (datos no representados), reflejando su alta especificidad para la diana. Por el contrario, la expresión del banco mutagenizado produjo una baja actividad de recombinación en todos los subconjuntos de *loxLTR*. La división de las mutaciones facilitó el reconocimiento del banco de Cre y por consiguiente sirvió como punto de partida para posteriores ciclos de evolución dirigidos. Los ciclos reiterativos de evolución dirigida produjeron enriquecimiento de los bancos de recombinasa con candidatos funcionales (véase la figura 2B). El número de ciclos de evolución necesarios para obtener recombinasas eficaces para cada *loxLTR* variaba entre los subconjuntos de *loxLTR*, pero finalmente se observó actividad de recombinación eficaz de los bancos para todos los subconjuntos.

V. Combinación de los bancos y mezclado de ADN para permitir la recombinación del siguiente subconjunto superior

Para probar si una estrategia combinatoria permitiría entonces la recombinación de los siguientes subconjuntos superiores, los bancos la y lb, y 2a y 2b, respectivamente, se combinaron y mezclaron.

Se llevó a cabo el mezclado de ADN (Stemmer, 1994) para recombinar los mutantes de Cre obtenidos *in vitro* después de cada tercer ciclo de evolución y además para recombinar bancos de recombinasa de subconjuntos inferiores para iniciar la evolución frente a los sitios diana *loxLTR* superiores. En resumen, los fragmentos de ADN que contienen el gen de la recombinasa se fragmentaron al azar con ultrasonidos utilizando amplitud de 12% durante 5 minutos con 30 s de encendido y 5 s de apagado utilizando un 450-D Digital Sonifier de Branson. Los fragmentos del tratamiento con ultrasonidos (100-400 pb de tamaño) se purificaron utilizando el kit de purificación de RCP (Qiagen). Para volver a ensamblar los fragmentos, 2 µg del ADN tratado con ultrasonidos se añadieron a 50 µl de una mezcla de RCP y se ampliaron utilizando el mismo programa mencionado anteriormente (véase el ejemplo 2.IV). Se utilizaron 3 µl de este producto de reacción de RCP sin cebador como plantilla para la siguiente RCP con cebadores P1 (5'-TCTACTGTTTCTCCATA-3', SEC ID nº 19) y P3 (5'-GCGGATGAGAGAAGATT-3'; SEC ID nº 21) en 50 µl de una mezcla de RCP con las mismas condiciones de ciclación. El banco mezclado (producto final de RCP) se digirió con *BsrGI* y *XbaI* y se volvió a clonar en los vectores pEVO apropiados portadores de *loxLTR1* y *loxLTR2*, respectivamente. La combinación de mutaciones de los diferentes bancos produjo efectos sinérgicos y condujo a la generación de recombinasas, *loxLTR1* y *loxLTR2* recombinadas (véase la figura 2B), demostrando que puede utilizarse una estrategia de evolución a través de intermedios para conseguir una actividad deseada.

VI. Combinación de los bancos y mezclado de ADN para permitir la recombinación del sitio diana asimétrico dentro de la LTR

La secuencia *loxP* es un sitio simétrico que está unido por dos monómeros de Cre. Una recombinasa que recombina un sitio diana asimétrico por lo tanto tiene que reconocer los hemisitios de secuencia variable. A fin de comprobar si una recombinasa puede obtenerse por dirección de la evolución de la proteína unida al sustrato recombinando la secuencia diana *loxLTR* asimétrica, los bancos de *loxLTR1* y *loxLTR2* se combinaron y mezclaron y se ensayó la recombinación en el vector de evolución que alberga el sitio diana *loxLTR* asimétrico. Se detectó actividad de recombinación muy baja en los primeros ciclos que se enriqueció para candidatos funcionales en ciclos posteriores (véase la Figura 2B), demostrando que la simetría en el sitio diana no es un requisito previo para la reacción de recombinación específica de sitio.

Después de un total de 126 ciclos de evolución, se detuvo el proceso de evolución y se examinaron las propiedades de recombinación de las recombinasas específicas para *loxLTR* individuales. Cincuenta recombinasas individuales se analizaron funcionalmente utilizando análisis de restricción en *E. coli* (datos no representados).

La recombinasa más activa (denominada Tre para LTR recombinasa) presentaba recombinación eficaz del sitio *loxLTR* con alguna actividad residual para *loxP* cuando se probó en un ensayo indicador basado en lacZ (véanse las figuras 7A y B). Para cuantificar la especificidad de la diana de Tre se examinaron sus propiedades de recombinación en los vectores de la evolución de todos los subconjuntos de *loxLTR* (véase la figura 7C). Como en el ensayo indicador, Tre recombinó eficazmente la secuencia *loxLTR* y presentó actividad residual en *loxP* (véase figura 7C). Tre también presentó recombinación eficaz en *loxLTR2b* y actividad residual en *loxLTR2*, pero no se observó recombinación en *loxLTR1a*, *loxLTR1b*, *loxLTR1* ni *loxLTR2a* (véase figura 7C). Esto es notable al tener en cuenta que Tre evolucionó desde estos subconjuntos. Esta observación confirma descubrimientos anteriores que la

especificidad diana se recuperó después de la relajación inicial en evolución dirigida durante muchos ciclos de generación (Buchholz y Stewart, 2001; Santoro y Schultz, 2002); Matsumura y Ellington, 2001).

VII. Secuenciación de recombinasas evolucionadas

Se secuenciaron recombinasas evolucionadas de todos los subconjuntos y *loxLTR* para supervisar el proceso de evolución. Las secuencias pusieron de manifiesto el agrupamiento de mutaciones resultante de los subconjuntos diferentes que se combinaron en el curso de la evolución y se complementaron por nuevos grupos en los subconjuntos superiores (véase la figura 4 y la tabla 1).

La tabla 1 muestra mutaciones de aminoácidos en la recombinasas secuenciadas para los subconjuntos *loxtr* indicados de recombinasas evolucionadas. Los residuos sombreados ponen en contacto el ADN en la estructura cristalina de Cre. Los restos hipervariables (también mostrados en la figura 5) se muestran en negrita tanto para los sitios en contacto de ADN como sin contacto.

Tabla 1

Recombinasas evolucionadas	Mutaciones de aminoácidos
1a.1	K25E, D29G, A127V, E138G, M149I, D341N
1a.2	M28A, M97I , V125I, I166T , G229D, D232V
1a.3	G82S, E150A, L171V, V204A, I320M
1a.4	A175G
1a.5	N3D , V7L , K62R, M97I , E138G, D329A
1a.6	D29A, V145I, E262Q , S305P, T316A
1a.7	S2T, N3K , L4S, N60S, M97I, R179G, F239L, E262Q , D278G , I320S
1a.8	N3D , V7L , K62R, V204A, P234L, S305P
1b.1	N59T, I88V, I166V , I174M , S186T, S214I, P234L, V242A , E262A
1b.2	V7L , K62N, A112V, R146C, L161Q, F163L, G208R, R241P , E262G , D341G
1b.3	V7L , Q94L , S108G , E123K, N151T, T268A, N317T , I320M
1b.4	V7L , C155R, E262Q , N317T , I320S
1b.5	N3D , V7L , S108C , D143N, E262Q , N317T , I320S
1b.6	N3D , V7L , S114P, D189G, E262G , I306T
1b.7	N3D , V7L , S108C , D143N, E262Q , N317T , I320S
1b.8	L4I, V7L , K86R , S108G , E210K, I320S , D343E
2a.1	L5P, L14F, Q156R , D189G, M193A, L215Q, I320S
2a.2	G93A , A112T, E138G, D143G, D278G , T316A
2a.3	V7L , Q94L , R118G , A127P, D153N, A178P, N319S
2a.4	N10H , P107I , T253S, T316A, I320S
2a.5	T6S, D21E, Q94L , L98I, E138G, G198S , A231V
2a.6	T19M, Q35R , E150V, G191E, G198S , S254C, D278G
2a.7	T6S, D21E, Q94L , L98I, E138G, G198S , A231V
2a.8	T19M, Q35R , E150V, G191E, G198S , S254C, D278G
2b.1	V7L , V16A , M30V , Q35P , N59S, A131V , D157E, A249T, R259C , E262Q , N317T , I320S , T332A
2b.2	V7L , R24H, M28I, A36V, F37I , D73Y, Y77H, P107L , A131V , T206A, E262A , D277G, N317T , I320S
2b.3	V7L , V16A , M30V , Q35P , S108G , G208R, E262A , N317T , I320S , G342W
2b.4	V7L , V16A , M30V , V71A, N111S, Q156K , A249T, Q255R, R259C , E262Q , N317T , I320S
2b.5	N3D , V7L , M30V , Q35P , S108G , A249T, E262Q , A267G, N317T , I320S
2b.6	V7L , V16A , M30V , Q35P , Y77H, G93C , Q156K , R259C , E262Q , N317T , I320S
2b.7	V7L , V16A , M30V , Q35P , S108G , G208R, E262A , N317T , I320S , G342W
2b.8	V7L , R24H, M28I, A36V, F37L, D73Y, Y77H, P107L , A131V , T206A, E262A , D277G, N317T , I320S

1.1	L75F, V85A, Q94L, S108G, C155R, G198S, E262G, D278G, N317H, I320S
1.2	V85A, Q94L, S108G, G198S, D232E, E262G
1.3	V48I, R50Q, Q94L, V230A, S257T, E262R, N317T, I320S
1.4	V23A, L75F, V85A, Q94L, R101Q, S108G, G230A, E262H, N317T, I320S
1.5	V7L, Q9H, N10S, V23A, D29E, R34H, K62E, L75F, V85A, Q94L, S108G, L164P, T206A, F239L, V247A, E262H, N317T, I320S
1.6	V85A, Q94L, S108G, D153N, G198S, D232E, E262G, N317T, I320S
1.7	V85A, Q94L, S108G, I174M, T206A, F239L, E262A, D278G, N317T, I320S
1.8	L75F, V85A, Q94L, S108G, G198S, E262R, D278G, N317T, I320S
2.1	T61, V7L, V16A, R24C, M30V, K57E, G93C, Q156K, I166V, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, I272V, N317T, I320S
2.2	M44T, S51L, Y77H, G93C, P107L, N245Y, R259Y, E262Q, G263R.
2.3	N3D, V7L, V16A, Q35P, K57E, Y77H, G93C, P107L, A131V, S147L, Q156K, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S
2.4	V7L, V16A, V23A, M30V, Y77H, G93C, P107L, Q156K, R243G, N245Y, R259Y, E262Q, G263R.
2.5	V7L, G93C, Q156K, A175G, E222G, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S
2.6	Q35P, Y77H, G93C, Q156K, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S
2.7	M28I, M30V, Q35P, Y77H, G93C, A131V, N245Y, R259Y, E262Q, G263R
2.8	K57E, G93C, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S
Tre	V7L, Q9H, N10S, V16A, M30V, Q35P, K43E, Y77H, G93C, Q94L, A131T, I166V, K244R, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S.
Loxltr.1	E22G, F37S, A84V, V85A, Q94L, S108G, K132N, I166V, A175S, N245Y, R259Y, Q281R, N317T, I320S.
Loxltr.2	L5Q, V7L, P12S, L14S, P15L, V23A, A80V, V85A, Q94L, S108G, G198S, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, T268A, N317T, I320S.
Loxltr.3	T6I, V7L, Q9H, N10S, V23A, V85A, Q94L, K132N, I166V, A175S, D232G, N245Y, R259H, E262Q, G263R, N317T, I320S.
Loxltr.4	N59W, Y77H, V85A, Q94L, S108G, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S.
Loxltr.5	V7L, Q9H, N10S, K57E, V85A, Q94L, S108G, G198S, N245Y, R259H, E262Q, G263R, Q281R, N317T, I320S.
Loxltr.6	V7L, Q9H, N10S, V23A, V85A, I88V, Q94L, S108G, M149I, I166V, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S.
Loxltr.7	V7L, Q9H, N10S, V23A, R34H, V85A, Q94L, S108G, K132N, I166V, A175S, I225V, N245Y, R259Y, E262Q, G263R, N317T, I320S.

En total, Tre presenta 19 cambios de aminoácidos en comparación con Cre, originándose muchas de estas mutaciones procedentes de los diferentes subconjuntos (véase la figura 5).

5

Ejemplo 3

Caracterización de la Tre recombinasa

10 I. Propiedades de recombinación de Tre en células de mamíferos

Se cultivaron células HeLa a 37°C en 5% de CO₂ en MEMD que contenía 100 unidades/ml de penicilina y estreptomocina y enriquecidas con FCS al 10% salvo indicación en sentido contrario.

15 Se obtuvo una estirpe celular del indicador pSVloxtr resistente a la puromicina por transfección de 2 x 10⁶ células con 8 µg del plásmido indicador utilizando reactivo de transfección Effectene (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y selección con 5 µg/ml de puromicina (Invivogen). La estirpe celular estable final se cultivó en presencia de 3 µg/ml de puromicina.

20 Las células HeLa se cotransfectaron con plásmidos de expresión e indicador de recombinasa en una proporción de 1:2 en formato de 6 pocillos utilizando Effectene (Qiagen). Para las transfecciones se utilizó un total de 0,6 µg de ADN. Se llevaron a cabo transfecciones en paralelo con la versión recombinada de los plásmidos indicadores para calcular el porcentaje de los plásmidos indicadores recombinados.

Se evaluó la actividad de recombinasa 48 horas después de la transfección ensayando las actividades relativas de β -galactosidasa 48 horas después de la transfección utilizando el kit Tropix Galacto-Light (Applied Biosystems, Bedford, MA) según el protocolo del fabricante. En resumen, las células HeLa se lavaron con PBS 48 horas después de la transfección y se fijaron con formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,1%, permeabilizado con Triton-X 100 al 0,5% y se tiñó durante la noche a 37°C con solución de tinción que contiene 1 mg/ml de X-gal, MgCl₂ 2 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, y ferrocianuro de potasio 5 mM. Las eficiencias de recombinación se corrigieron para el contenido de proteína total en el lisado celular medido por kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL).

Como en los ensayos con *E. coli*, Cre recombinó eficientemente el indicador *loxP*, pero no recombinó *loxLTR* y Tre presentaba recombinación eficaz en el indicador *loxLTR* y alguna actividad residual en *loxP* (véase figura 8A y B). Para investigar si Tre puede recombinar su diana en un contexto genómico, una estirpe celular de indicador *loxLTR* estable se probó para recombinación después de la transfección con un plásmido de expresión Tre.

Se generó la estirpe celular estable de *loxLTR* por selección con puromicina (2 μ g/ml) de células HeLa transfectadas con el plásmido pSVloxtr. Para el ensayo de recombinación, esta estirpe celular se transfectó con 0,8 μ g de plásmidos falso, Cre o Tre utilizando Effectene en formato de 6-pocillos y se ensayó para las actividades de β -galactosidasa 48 horas después de la transfección utilizando el kit de Galacto-Light (Applied Biosystems, Bedford, MA). Las actividades de β -galactosidasa se corrigieron para las eficacias de transfección por medición de las actividades de renilla luciferasa en lisados celulares.

Los ensayos RCP y las mediciones de actividad de β -galactosidasa demostraron que Tre recombina secuencias *loxLTR* envueltas en cromatina (véanse las figuras 8C y D).

Para los ensayos de RCP la estirpe de células HeLa *loxLTR* se transfectó con los vectores de expresión de recombinasa respectivos utilizando Effectene. Se lavaron las células transfectadas con PBS después de 48 horas y se trataron con tripsina. El ADN genómico se aisló utilizando el minikit QIAamp DNA Blood (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se analizó el ADN genómico (3 μ g) para recombinación utilizando cebadores P' (5'-GCCTCGGCCTAGGAACAGT-3'; SEC ID n° 22) y P'' (5'-CCGCCACATATCCTGATCTT-3'; SEC ID n° 23) utilizando el programa RCP con 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s; hibridación a 62°C durante 30 s y alargamiento a 72°C durante 40 s en 50 μ l de reacción de RCP que contiene 1x tampón de RCP, 250 μ M de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ y 1,5 unidades de BioTaq ADN polimerasa. Los productos de la RCP se observaron en un gel de agarosa al 0,7%.

II. Examen de recombinación mediado por Tre en el contexto de LTR del VIH-1

Se generaron montajes del indicador Tat del VIH y se probaron en ensayos de Tat (véase la figura 9). La proteína Tat es un transactivador vírico esencial que regula la transcripción dirigida por el activador LTR del VIH (Emerman y Malim, 1998). Para análisis posteriores se introdujo la secuencia *loxLTR* en un vector indicador VIH-luciferasa (pVIH/T1/LUC; vector de referencia) en HXB3 LTR del VIH-1 (Ratner *et al.*, 1985). Además, otra copia de la secuencia *loxLTR* se insertó en 3' de la secuencia de codificación de luciferasa para generar pVIH/T2/LUC (representado en la Fig. 9A). Por lo tanto, la transactivación de Tat da como resultado la expresión de luciferasa de luciérnaga impulsada por el activador LTR en estos vectores.

Para ensayos de transactivación de Tat temporales, las células HeLa se transfectaron en formato de 12 pocillos utilizando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen). La mezcla de transfección contenía 0,16 μ g de VIH/T2/LUC o VIH/T1/LUC que expresan luciferasa de luciérnaga, 0,16 μ g de vector pRes-neo-Tre recombinasa o vector vacío como referencia negativa, 0,08 μ g del vector Tat o pADnc3 como referencia negativa para Tat. Las células se lisaron 48 horas después de la transfección y se ensayó la actividad de luciferasa de luciérnaga usando kit de ensayo Renilla luciferasa (Biotium, Inc., Hayward, CA). Se corrigieron las actividades por eficacia de transcripción utilizando un vector lacZ como referencia interna y midiendo la actividad de β -galactosidasa en los lisados celulares.

Cuando las células HeLa se cotransfectaron con un vector de expresión Tre junto con el vector Tat y pVIH/T2/LUC, se observó una disminución triple de la actividad de luciferasa (véase la figura 9C). En cambio, no se detectó ninguna disminución en la expresión de luciferasa cuando se realizó el mismo experimento utilizando la referencia pVIH/T1/LUC (véase la figura 9B).

Para demostrar que la disminución observada en la expresión de luciferasa fue un resultado de la recombinación y no de bloqueo la actividad de Tat o la transcripción en el activador LTR por la recombinasa, se realizó el análisis de RCP, analizando por recombinación en la transactivación Tat (véase la figura 9D).

El análisis por RCP de la recombinación en el ensayo de transactivación Tat se llevó a cabo en ADN aislado de células HeLa transfectadas con los vectores indicadores de VIH en presencia o ausencia de la recombinasa, utilizando cebadores L1 (5'-GAAGGTGGGTTTTCCAGTCA-3'; SEC ID n° 24) y L2 (5'-AGGGAAGAAAGCGAAAGGAG-3'; SEC ID n° 25) utilizando el programa RCP con 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación a 60°C durante 30 s y estiramiento a 72°C durante 40 s en 25 μ l de una reacción de RCP que contiene 1x tampón de RCP, 250 μ M de cada dNTP, 3 mM de MgCl₂ y 1,5 unidades de BioTaq ADN

polimerasa. Los productos de la RCP se observaron en un gel de agarosa al 0,7%. Los productos de RCP se extrajeron en gel, se purificaron utilizando el kit de extracción en Gel (Qiagen) y se utilizaron para secuenciación.

La recombinación produce un tamaño de banda de 756 pb debido a la eliminación de la secuencia de codificación de luciferasa, mientras que en ausencia de recombinación el tamaño de banda es de 2,7 kb. La RCP en las células transfectadas con el vector pVIH/T1/LUC, que contienen sólo un sitio *loxLTR*, produjo sólo la banda de 2,7 kb en presencia y en ausencia de Tre. En cambio, RCP en las células transfectadas con el vector pVIH/T2/LUC presentaba predominantemente la banda inferior, demostrando que la reducción de activación de Tat era debida a la escisión mediada por Tre de la casete de luciferasa (véase la figura 9D). La extracción en gel de los fragmentos de la RCP seguida de secuenciación confirmó la escisión precisa de la secuencia flanqueado por *loxLTR* (datos no representados).

Ejemplo 4

15 Escisión de un provirus completo del genoma de células humanas infectadas con VIH-1

Se examinó la capacidad de Tre para escindir un provirus completo del genoma de células humanas infectadas con VIH-1.

Para probar esto, se construyó un ADN provírico, procedente de la cepa NL4-3 del VIH-1 (Adachi *et al.*, 1986), que contiene la secuencia *loxLTR* en sus 5' y 3' de LTR (representado en la figura 10A). En esta construcción, el marco de lectura nef, que no es indispensable para la replicación del virus en cultivo celular, se sustituyó por el gen de resistencia a la puromicina. Además, el aumento de la longitud total del genoma fue compensado por la eliminación de secuencias específicas para *env*.

Se produjeron pseudotipos víricos por cotransfección temporal de células 293T con este ADN provírico y un vector de expresión que codifica la glucoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). En resumen, se produjeron pseudotipos del VIH-1 por cotransfección temporal de 1×10^6 células 293T con 3 μ g de pNL2 Δ envPuro y 3 μ g de pCMV-VSV-G en OptiMEM I (Invitrogen) sin antibióticos utilizando 4 μ l de polietilimina (PEI; 1 mg/ml) según el protocolo del fabricante (Polysciences, Inc.). El día 2 después de la transfección se recogió el sobrenadante vírico y se pasó a través de filtros de 0,2 μ m de tamaño de poro para garantizar la eliminación de cualesquiera de los agregados víricos y células y la concentración de antígeno p24^{Gag} se determinó por ELISA (Innotest HIV p24 Antigen mAb; Innogenetics. N. V.).

Posteriormente, 5×10^5 células HeLa, cultivadas en DMEM que contenía suero de ternero fetal al 15% (Pansystems GmbH) y antibióticos (penicilina y estreptomina), se infectaron en una placa de seis pocillos por espinoculación (O'Doherty *et al.*, 2000) con 1.000 ng/ml del virus pseudotipado puede junto con 1 μ g/ml de polibreno (Sigma-Aldrich) a 1.200 x g durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras 24 horas de la infección se cambió el medio de cultivo y las células se lavaron para eliminar el virus libre. 3 días después de la infección el cultivo celular se enriqueció con 1 μ g/ml de puromicina (Sigma-Aldrich) durante 2 semanas y con 0,5 μ g/ml de puromicina durante otras 4 semanas para seleccionar y clonar células que liberan partículas de virus infectadas. El medio se cambió cada dos días para eliminar las células muertas.

Las células que liberan partículas de virus infectadas se transfectaron a continuación con un plásmido que expresa Tre o con el vector de control original, llevando ambos también el gen de resistencia a neomicina. En los grupos de células resistentes a la neomicina respectivas se hizo seguimiento de la actividad de la recombinasa y la producción de virus.

Se aisló ADN genómico completo de las células HeLa infectadas utilizando el kit Blood & Cell Culture DNA Midi (Quiagen) según el protocolo del fabricante. La RCP cuantitativa en tiempo real puso de manifiesto que la presencia de secuencias gag específicas para VIH-1 en el genoma celular disminuían constantemente con el tiempo en las células que expresan Tre, en comparación con células de referencia (véase la figura 10B, diagrama superior). RCP cuantitativa específica para gag de VIH-1 (gag-directo: 5'-ATCAATGAGGAAGCTGCAGAA-3' (SEC ID n° 26), gag-inverso: 5'-GATAGGTGGATTATGTGTCAT-3' (SEC ID n° 27), gag-sonda: 5'-FAM-ATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAA-TAMRA-3' (SEC ID n° 28)) y 5'/3' recombinación de LTR (LTR-directa: 5'-GATGGTGTACAAGCTAGTAC-3' (SEC ID n° 29), LTR-inversa: 5'-CTGTCAAACCTCCACTCTAAC-3' (SEC ID n° 30), LTR-sonda: 5'-FAM-AAGGAGAGAACAACATCTATTACAC-TAMRA-3' (SEC ID n° 31)) se realizó de la manera siguiente: 40 ciclos que contienen 100 ng de ADN genómico, cebador directo 300 nM, cebador inverso 900 nM y sonda de hibridación 200 nM sondeo utilizando Platinum qPCR Super Mix UDG (Invitrogen) en un sistema de RCP en tiempo real 7500 Fast de Applied Biosystems. Cada muestra se probó por triplicado, y los resultados se normalizaron utilizando ampliación del mismo ADN genómico con cebadores de β -globina humana (HBG-directo: 5'-CTTAATGCCTTAACATTGTGTATAA-3' (SEC ID n° 32), HBG inversa: 5'-GAATATGCAAATAAGCACACATATAT-3' (SEC ID n° 33), HBG-sonda: 5'-FAM- ACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTAC-TAMRA-3' (SEC ID n° 34)).

Después de 10 semanas de cultivo, las secuencias *gag* no pudieron ya ser detectadas. Este resultado fue reflejado estrechamente por un análisis similar en el que se determinó la recombinación de 5' y 3' LTR (véase la figura 10B;

diagrama inferior).

Además, el cese del brote de partículas, que se rastreó determinando las concentraciones de antígeno p24Gag en los sobrenadantes del cultivo, se produjo con una cinética ligeramente retardada, dando como resultado 100% de inhibición de la liberación de partículas en comparación con el cultivo de referencia insuficiente en Tre la semana 12 (véase figura 10C, diagrama superior). Un ensayo de citotoxicidad en paralelo con alamarBlue (Serotec) no pudo grabar ningún efecto tóxico producido por Tre en el metabolismo celular (véase la figura 10C, panel inferior).

La observación de la expresión de Gag por láser por microscopia de inmunofluorescencia con láser demostró la completa desaparición de las células infectadas de manera productiva en el cultivo positivo a Tre con el tiempo (véase la figura 10D). Para la microscopia de inmunofluorescencia indirecta se cultivaron células HeLa infectadas con VIH-1 en cubreobjetos, se lavaron con PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 3% durante 25 min. Todas las etapas de incubación se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Tras 10 minutos de incubación con glicina 100 mM/PBS, se permeabilizaron las células en Triton X-100 al 0,1%/PBS durante 4 min y se incubaron en BSA al 1%/PBS durante 30 min. Se tiñeron las proteínas en BSA al 1%/PBS utilizando anticuerpos primarios que reconocen p55^{Gag} del VIH-1 (dilución 1:100, anticuerpo monoclonal 183-H12-5C de ratón con VIH-1 específico para Gag suministrado por B. Chesebro y K. Wehrly, AIDS Research and Reference Reagent Program, Division AIDS, NIAID, NIH) o anti-Cre de conejo (dilución 1:500) durante 45 minutos, seguido de anticuerpos antirratón en cabra o anticonejo en cabra secundarios apropiados (ambos de Rockland Immunochemicals, Inc., 1:150 de dilución) acoplados a Cy2. Los núcleos se observaron por tinción con DRAQ5 (dilución 1:1000, Alexis Biochemicals) durante 10 min. Las células se montaron en medio moviol y se analizaron utilizando un microscopio de exploración por láser LSM 510 Meta de Zeiss. Curiosamente, las células de referencia sobrevivieron a la reexposición de estos cultivos a la puromicina la semana 8, pero produjo efectos tóxicos graves y muerte celular definitiva en el cultivo positivo a Tre (véase la figura 11). Esta observación puede explicarse por eliminación mediada por Tre del gen provírico que codifica la resistencia a la puromicina (compárese con la figura 10A).

Listado de referencias

- Abremski K, Hoess RH, Sternberg N (1983) "Studies on the properties of PI site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination." *Cell* 32, 1301-1311.
- Abremski K, Hoess R (1983) "Bacteriophage PI site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein." *J. Biol. Chem.* 259, 1509-1514.
- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA (1986) "Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone." *J. Virol.* 59, 284-291.
- Alper H, Fischer C, Nevoigt E, Stephanopoulos G (2006) "Tuning genetic control through promoter engineering" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12678-12683.
- Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D (2002), Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration and broad host range." *J. Virol.* 76, 1488-1495.
- Blackard JT, Renjifo BR, Mwakagile D, Montano MA, Fawzi WW, Essex M (1999) "Transmission of human immunodeficiency type 1 viruses with intersubtype recombinant long terminal repeat sequences." *Virology* 254, 220-225.
- Bloom JD, Meyer MM, Meinhold P, Otey CR, MacMillan D, Arnold FH (2005) "Evolving strategies for enzyme engineering." *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 447-452.
- Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF (1996) "Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases : implications for applied site-specific recombination." *Nucl. Acids Res.* 24, 4256-4262.
- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF (1998) "Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis." *Nat. Biotechnol.* 16, 657-662.
- Buchholz F, Stewart AF (2001) "Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution." *Nat. Biotechnol.* 19, 1047-1052.
- Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC (2005) "Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells." *Nature* 435, 108-114
- Chun T-W, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS (1998) "Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8869-8873.

- Coates CJ, Kaminski JM, Summers JB, Segal DJ, Miller AD, Kolb AF (2005) "Site-directed genome modification: derivatives of DNA-modifying enzymes as targeting tools." *Trends Biotechnol.* 23, 407-419.
- 5 Collins CH, Yokobayashi Y, Umeno D, Arnold FH, (2003) "Engineering proteins that bind, move, make and break DNA." *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 665.
- Combes P, Till R, Bee S, Smith MC (2002) "The streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi)C31-encoded site-specific recombination system." *J. Bacteriol.* 184, 5746-5752.
- 10 Cramer A, Raillard SA, Bermudez E, Stemmer WP (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution." *Nature* 391, 288-291.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A (1994) "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes." *J. Biol. Chem.* 269, 10444-10450.
- 15 Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Chassaing G, Prochiantz A (1996) "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent." *J Biol Chem* 271, 18188-18193.
- Donovan, P.J., Gearhart, J. (2001) "The end of the beginning for pluripotent stem cells." *Nature* 414, 92-97.
- Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP (1998) "AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 coreceptor." *Nature Medicine* 4, 72-77.
- 25 Dybul M, Fauci AS, Bartlett JG, Kaplan JE, Pau AK (2002) "Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents." *Annals of Internal Medicine* 137, 381-433.
- Edelman GM₇ Meech R, Owens GC, Jones FS (2000) "Synthetic promoter elements obtained by nucleotide sequence variation and selection for activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3038-3043.
- 30 Emerman M, Malim MH (1998) "HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology." *Science* 280, 1880-1884.
- 35 Finzi D, Hemankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF (1997) "Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy." *Science* 278, 1295-1300.
- Flowers CC, Woffendin C, Petryniak J, Yang S, Nabel GJ (1997)
- 40 "Inhibition of recombinant human immunodeficiency virus type 1 replication by a site-specific recombinase." *J. Virol.* 71, 2685-2692.
- Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Valentine FT, Jonas L, Meibohm A, Emini EA, Chodakewitz JA (1997) "Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy." *N. Engl. J. Med.* 337, 734-739.
- 45 Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J (1995) "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." *J. Bacteriol.* 177, 4121-4130.
- 50 Hartenbach S, Fussenegger M (2006) "A novel synthetic mammalian promoter derived from an internal ribosome entry site." *Biotechnology and Bioengineering* 95, 547-559.
- Hauber I, Bevec D, Heukeshoven J, Kratzer F, Horn F, Choidas A, Harrer T, Hauber J (2005) "Identification of cellular deoxyhypusine synthase as a novel target for antiretroviral therapy." *J. Clin. Invest.* 115, 76-85.
- 55 Hazuda DJ, Young SD, Guare JP, Anthony NJ, Gomez RP, Wai JS, Vacca JP, Handt L, Motzel SL, Klein HJ, Dornadula G, Danovich RM, Witmer MV, Wilson KA, Tussey L, Schleif WA, Gabryelski LS, Jin L, Miller MD, Casimiro DR, Emini EA, Shiver JW (2004) "Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques." *Science* 305, 528-532.
- 60 Hoess RH, Abremski K (1985) "Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system." *J. Mol. Biol.* 181, 351-362.
- 65 Johannes TW, Zhao H (2006) "Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways." *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 261-267.

- Krasnow MA, Cozzarelli NR (1983) "Site-specific relaxation and recombination by the Tn3 resolvase: Recognition of the DNA path between oriented res sites." *Cell* 32, 1313-1324.
- 5 Kulkosky J, Bray S (2006) "HAART-persistent HIV-1 latent reservoirs: their origin, mechanisms of stability and potential strategies for eradication." *Curr. HIV Res.* 4, 199-208.
- Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, Montaner JS, Piliro PJ, Trottier B, Walmsley S, Cohen C, Kuritzkes DR, Eron Jr. JJ, Chung J, DeMasi R, Donatucci L, Drobnes C, Delehanty J, Salgo M (2003) "Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America." *N. Engl. J. Med.* 348, 2175-2185.
- 10 Lee YS, Park JS (1998) "A novel mutant lox^P containing part of long terminal repeat of HIV-1 in spacer region: presentation of possible target site for antiviral strategy using site-specific recombinase." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 253, 588-593.
- 15 Lee YS, Kim ST, Kim GW, Lee M, Park JS (2000) "An engineered lox sequence containing part of a long terminal repeat of HIV-1 permits Cre recombinase-mediated DNA excision." *Biochem. Cell Biol.* 78, 653-658.
- Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, Coombs RW, Richman DD, Mellors JW, Coffin JM, Bosch RJ, Margolis DM (2005) "Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study" *Lancet* 366, 549-555.
- 20 Lewandoski, M. (2001) "Conditional control of gene expression in the mouse." *Nat. Rev. Genet.* 2, 743-755.
- 25 Lin Q, Jo D, Gebre-Amlak KD, Ruley HE (2004) "Enhanced cell-permeant Cre protein for site-specific recombination in cultured cells." *BMC Biotechnol.* 4, 25.
- Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD (2002) "Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV." *N. Engl. J. Med.* 347, 385-394.
- 30 Macara IG (2001) "Transport into and out of the nucleus." *Microbiology and molecular biology reviews* 65, 570-594.
- Malim MH, Hauber J, Fenrick R, Cullen BR (1988) "Immunodeficiency virus rev transactivator modulates the expression of the viral regulatory genes." *Nature* 335, 181-183.
- 35 Marcello A (2006) "Latency: the hidden HIV-1 challenge." *Retrovirology* 3, 7.
- Matsumura I, Ellington AD (2001) "In vitro evolution of beta-glucuronidase into a beta-galactosidase proceeds through nonspecific intermediates." *J. Mol. Biol.* 305, 331-339.
- 40 Minshull J, Stemmer WP. (1999) "Protein evolution by molecular breeding." *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 284-290.
- 45 Nagy A (2000) "Cre recombinase : the universal reagent for genome tailoring." *Genesis* 26, 99-109.
- Needleman SB, Wunsch CD (1970) "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins." *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- 50 Nolden L, Edenhofer F, Haupt S, Koch P, Wunderlich FT, Siemen H, Brustle O. (2006) "Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase." *Nat. Methods* 3, 461-467.
- O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH (2000) "Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding." *J. Virol.* 74, 10074-10080.
- 55 Pearson WR, Lipman DJ (1988) "Improved tools for biological sequence comparison." *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2444-2448.
- Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. (2002) "Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: A tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4489-4494.
- 60 Ratner L, Starcich B, Josephs SF, Hahn BH, Reddy EP, Livak KJ, Petteway SR, Jr., Pearson ML, Haseltine WA, Arya SK, (1985) "Polymorphism of the 3' open reading frame of the virus associated with the acquired immune deficiency syndrome, human T-lymphotropic virus type III." *Nucl. Acids Res.* 13, 8219-8229.
- 65

- Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, Chernomordik LV (2005) "Cellular uptake of the unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparin sulfate receptors." *J. Biol. Chem.* 280, 15300-15306.
- 5 Rufer AW, Sauer B (2002) "Non-contact positions impose site selectivity on Cre recombinase." *Nucl. Acids Res.* 30, 2764-2771.
- Ruhl M, Himmelspach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaksche H, Wolff B, Aschauer H, Farrington GK, Probst H, Bevec D, Hauber J (1993) "Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating transactivation" *J. Cell Biol.* 123, 1309-1320.
- 10 Sanger F, Nickler S, Coulson AR (1977) "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- 15 Santoro SW, Schultz PG (2002) "Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4185-4190.
- Saraf-Levy T, Santoro SW, Volpin H, Kushnirsky T, Eyal Y, Schultz PG, Gidoni D, Carmi N (2006) "Site-specific recombination of asymmetric lox sites mediated by a heterotetrameric Cre recombinase complex." *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3081-3089.
- 20 Sauer B, McDermott J (2004) "DNA recombination with a heterospecific Cre homolog identified from comparison of the pac-cl regions of PI-related phages." *Nucl. Acids. Res.* 32, 6086-6095.
- 25 Schambach A, Bohne J, Chandra S, Will E, Margison GP, Williams DA, Baum C (2006) "Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells." *Molecular Therapy* 13, 391-400.
- Scherr M, Eder M (2002) "Gene Transfer into Hematopoietic Stem Cells Using Lentiviral Vectors." *Current Gene Therapy* 2, 45-55.
- 30 Shehu-Xhilaga M, Tachedjian G, Crowe SM, Kedzierska K. (2005) "Antiretroviral compounds: mechanisms underlying failure of HAART to eradicate HIV-1." *Curr. Med. Chem.* 12, 1705-1719.
- 35 Shimshek DR, Kim J, Hubner MR, Spergel DJ, Buchholz F, Casanova E, Stewart AF, Seeburg PH, Sprengel R (2002) "Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse." *Genesis* 32(1), 19-26.
- Smith Tf, Waterman MS (1981) "Overlapping genes and information theory." *J. Theor. Biol.* 91, 379-380.
- 40 Stark WM, Boocock MR, Sherratt DJ (1992) "Catalysis by site-specific recombinases." *Trends Genet.* 8, 432-439.
- Stemmer WPC (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling." *Nature* 370, 389-391.
- 45 Sternberg N, Hamilton D (1981) "Bacteriophage PI site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites." *J. Mol. Biol.* 150, 467-486.
- Van Duyne GD (2001) "A structural view of cre-loxP site-specific recombination." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 87-104.
- 50 Vives E, Brodin P, Lebleu B (1997) "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." *J. Biol. Chem.* 272, 16010-16017.
- Vives E (2003) "Cellular uptake of the TAT peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions." *J. Mol. Recognit.* 16, 265-271.
- 55 Volkert FC, Broach JR (1986) "Site-specific recombination promotes plasmid amplification in yeast." *Cell* 46, 541-550.
- Voziyanov Y, Konieczka JH, Stewart AF, Jayaram M (2003) "Stepwise manipulation of DNA specificity in FLP recombinase: progressively adapting FLP to individual and combinatorial mutations in its target site." *J. Mol. Biol.* 326, 65-76.
- 60 Yuan L, Kurek I, English J, Keenan R (2005) "Laboratory-directed protein evolution" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 373-92.

Listado de secuencias

<110> Heinrich-Pette-Institute for Experimental Virology and Immunology

5 <120> Utilización de una recombinasa adaptada para el tratamiento de las infecciones retrovíticas

<130> P 73207

<160> 35

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 34

15 <212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<220>

<221> misc feature

20 <222> (1). (13)

<223> secuencia que corresponde al hemisitio izquierdo del sitio diana asimétrico

<220>

<221> misc feature

25 <222> (14)..(21)

<223> secuencia que corresponde al separador del sitio diana asimétrico

<220>

<221> misc feature

30 <222> (22)..(34)

<223> secuencia que corresponde al hemisitio derecho del sitio diana asimétrico

<400> 1

35 acaacatcct attacacct atatgccaac atgg

<210> 2

<211> 1059

<212> ADN

40 <213> Artificial

<220>

<223> variante de Cre preparada artificialmente

45 <400> 2

atggtgccca agaagaagcg gaaggtgtcc aacctgctga ccctgcacca cagcctgccc 60

gcctctgctg ccgacgccac ctctgacgaa gtgaggaaga acctgatgga cgtgttcaga 120

gacagacccg ccttcagcga gcacacctgg gagatgctgc tgtccgtgtg tagaagctgg 180

gccgcctggt gtaagctgaa caaccggaag tggttccccg ccgagcccga ggatgtgaga 240

gactacctgc tgcacctgca ggccagagcg ctggccctga aaacctcca gcagacctg 300

tgccggctga acatgctgca caggagaagc ggcctgccta gaccagcga tagcaacgcc 360

gtgtccctgg tgatgagcg gatcaggaag gagaacgtgg acgccggcga gagaacaaag 420

caggccctgg ccttcgagag aaccgacttc gaccaagtga ggagcctgat ggagaacagc 480

gaccggtgcc aggacatcag aaacctggcc tttctgggcg tggcctacaa caccctgctg 540

aggatcgccg agatcgcccg gatcaggggtg aaggacatca gcagaaccga cggcggcaga 600

atgctgatcc acatcggcag gaccaagacc ctggtgtcca cagccggcgt ggagaaggcc 660

ctgagcctgg gcgtgaccaa actggtggag cgggtgatca gcgtgtccgg cgtggccgac 720

gacccaaca actacctgtt ctgtagagtg aggagatatg gcgtggccgc ccccagcggc 780

ES 2 379 206 T3

acetcccagc tgtccaccta cgcctgcag agaatcttcg aggccacca cagactgatc 840
 tacggcgcca aggatgatag cggccagaga tacctggcct ggagcggcca cagcgccaga 900
 gtgggagccg ccagagacat ggccagagcc ggcgtgtcca tccctgagat catgcaggcc 960
 ggaggatgga ccaccgtgaa cagcgtgatg aactacatcc ggaacctgga tagcgagacc 1020
 ggcgctatgg tgagactgct ggaggacggc gactgatga 1059

<210> 3
 <211> 351
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> variante de Cre preparada artificialmente

<220>
 <221> SIÑAL
 <222> (2)..(9)

<223> Secuencia de localización nuclear (SLN) para dirigir la proteína al interior del núcleo de las células de mamífero

<400> 3

Met Val Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser Asn Leu Leu Thr Leu His
 1 5 10 15

His Ser Leu Pro Ala Leu Pro Ala Asp Ala Thr Ser Asp Glu Val Arg
 20 25 30

Lys Asn Leu Met Asp Val Phe Arg Asp Arg Pro Ala Phe Ser Glu His
 35 40 45

Thr Trp Glu Met Leu Leu Ser Val Cys Arg Ser Trp Ala Ala Trp Cys
 50 55 60

Lys Leu Asn Asn Arg Lys Trp Phe Pro Ala Glu Pro Glu Asp Val Arg
 65 70 75 80

Asp Tyr Leu Leu His Leu Gln Ala Arg Gly Leu Ala Val Lys Thr Ile
 85 90 95

Gln Gln His Leu Cys Arg Leu Asn Met Leu His Arg Arg Ser Gly Leu
 100 105 110

Pro Arg Pro Ser Asp Ser Asn Ala Val Ser Leu Val Met Arg Arg Ile
 115 120 125

Arg Lys Glu Asn Val Asp Ala Gly Glu Arg Thr Lys Gln Ala Leu Ala
 130 135 140

Phe Glu Arg Thr Asp Phe Asp Gln Val Arg Ser Leu Met Glu Asn Ser
 145 150 155 160

Asp Arg Cys Gln Asp Ile Arg Asn Leu Ala Phe Leu Gly Val Ala Tyr
 165 170 175

Asn Thr Leu Leu Arg Ile Ala Glu Ile Ala Arg Ile Arg Val Lys Asp
 180 185 190

Ile Ser Arg Thr Asp Gly Gly Arg Met Leu Ile His Ile Gly Arg Thr
 195 200 205

Lys Thr Leu Val Ser Thr Ala Gly Val Glu Lys Ala Leu Ser Leu Gly
 210 215 220

ES 2 379 206 T3

Val Thr Lys Leu Val Glu Arg Trp Ile Ser Val Ser Gly Val Ala Asp
225 230 235 240

Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Phe Cys Arg Val Arg Arg Tyr Gly Val Ala
245 250 255

Ala Pro Ser Ala Thr Ser Gln Leu Ser Thr Tyr Ala Leu Gln Arg Ile
260 265 270

Phe Glu Ala Thr His Arg Leu Ile Tyr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Gly
275 280 285

Gln Arg Tyr Leu Ala Trp Ser Gly His Ser Ala Arg Val Gly Ala Ala
290 295 300

Arg Asp Met Ala Arg Ala Gly Val Ser Ile Pro Glu Ile Met Gln Ala
305 310 315 320

Gly Gly Trp Thr Thr Val Asn Ser Val Met Asn Tyr Ile Arg Asn Leu
325 330 335

Asp Ser Glu Thr Gly Ala Met Val Arg Leu Leu Glu Asp Gly Asp
340 345 350

<210> 4
<211> 67
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 4

atgagatcta caacatccta ttacacccta tatgccaaca tggaagcttg catgcctgca 60
gatcgag 67

15 <210> 5
<211> 57
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 5

25 ttgagatcta caacatccta tatgccaaca tggatgaact gtaccggttg ttagtga 57

<210> 6
<211> 67
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 6

atgagatcta caacatccta ttacacccta aataggatgt tgtaagcttg catgcctgca 60
gatcgag 67

<210> 7
40 <211> 67
<212> ADN

ES 2 379 206 T3

<213> Artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico

5 <400> 7

ttgagatcta caacatccta ttacacccta aataggatgt tgttcgaact gtaccggttg 60

ttagtga 67

10 <210> 8
<211> 67
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 8

atgagatctc catgttgga taacacccta tatgccaaca tggagcttg catgcctgca 60

20 **gatcgag 67**

<210> 9
<211> 67
<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico

30 <400> 9

ttgagatctc catgttgga taacacccta tatgccaaca tggtcgaact gtaccggttg 60

ttagtga 67

<210> 10
<211> 67
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 10

atgagatcta caacatcgta taacacccta tatacgatgt tgtaagcttg catgcctgca 60

gatcgag 67

45 <210> 11
<211> 67
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 11

55 **ttgagatcta caacatcgta taacacccta tatacgatgt tgttcgaact gtaccggttg 60**

ttagtga 67

<210> 12
<211> 67

ES 2 379 206 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 12

atgagatcta taacttccta ttacacccta aataggaagt tataagcttg catgcctgca 60
gatcgag 67

10 <210> 13
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 13

20 **ttgagatcta taacttccta ttacacccta aataggaagt tattcgaact gtaccggttg** 60
ttagtga 67

<210> 14
 <211> 67
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico

30 <400> 14

atgagatctc catcttcgta taacacccta tatacgaaga tggaagcttg catgcctgca 60
gatcgag 67

35 <210> 15
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador oligonucleotídico

<400> 15

ttgagatctc catcttcgta taacacccta tatacgaaga tggcgaact gtaccggttg 60
ttagtga 67

45 <210> 16
 <211> 67
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador oligonucleotídico

55 <400> 16

atgagatcta taagttggca taacacccta tatgccaact tataagcttg catgcctgca 60
gatcgag 67

ES 2 379 206 T3

5	<210> 17 <211> 67 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador oligonucleotídico	
10	<400> 17 ttgagatcta taagttggca taacacccta tatgccaact tattcgaact gtaccggttg ttagtga	60 67
15	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador oligonucleotídico	
20	<400> 18 caataaccct gataaatg	18
25	<210> 19 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador oligonucleotídico	
30	<400> 19 tctactgttt ctccata	17
35	<210> 20 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador oligonucleotídico	
40	<400> 20 tgtcgccctt attccct	17
45	<210> 21 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador oligonucleotídico	
50	<400> 21 gcggatgaga gaagatt	17
55	<210> 22 <211> 19 <212> ADN	
60		

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
5	<400> 22	
	gcctcggcct aggaacagt	19
10	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 23	
20	ccgccacata tctgatctt	20
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
30	<400> 24	
	gaaggtgggt ttccagtca	20
	<210> 25	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 25	
45	aggaagaaa gcgaaaggag	20
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 26	
55	atcaatgagg aagctgcaga a	21
	<210> 27	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
65	<400> 27	

	gatagtgga ttatgtgca t	21
5	<210> 28 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> sonda de oligonucleótido marcada con FAM en el extremo 5' y con TAMRA en el extremo 3'	
	<400> 28	
15	attgcaccag gccagatgag agaa	24
	<210> 29 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador oligonucleotídico	
	<400> 29	
25	gatggtgcta caagctagta c	21
	<210> 30 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador oligonucleotídico	
35	<400> 30	
	ctgtcaaacc tccactctaa c	21
40	<210> 31 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> sonda de oligonucleótido marcada con FAM en el extremo 5' y con TAMRA en el extremo 3'	
	<400> 31	
50	aaggagagaa caacatccta ttacac	26
	<210> 32 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador oligonucleotídico	
60	<400> 32	
	cttaatgcct taacattgtg tataa	25
65	<210> 33 <211> 26 <212> ADN	

ES 2 379 206 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador oligonucleotídico	
5	<400> 33	
	gaatgcaaa ataagcacac atatat	26
10	<210> 34	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> sonda de oligonucleótido marcada con FAM en el extremo 5' y con TAMRA en el extremo 3'	
	<400> 34	
20	actttacaca gtctgcttag tacattac	28
	<210> 35	
	<211> 34	
	<212> ADN	
25	<213> Bacteriófago P1	
	<400> 35	
	ataacttcgt ataatgtatg ctatcgaag ttat	34

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un vector de expresión que codifica una recombinasa adaptada, recombinando dicha recombinasa adaptada secuencias diana asimétricas dentro de la LTR del ADN provírico insertado en el genoma de una célula hospedadora, que comprende las etapas siguientes:
- 5
- (a) determinar la secuencia de la LTR del ADN provírico, identificando en ella secuencias con homología de por lo menos el 30% con las secuencias de hemisitio izquierdo y de hemisitio derecho de sitios diana conocidos de recombinasas, en el que las secuencias homólogas están separadas por un separador de 5 a 12 nucleótidos, y en el que las secuencias LTR homólogas con mayor homología con un sitio diana conocido representan la secuencia diana asimétrica;
- 10
- (b) preparar dos secuencias sintéticas, en el que la primera secuencia sintética corresponde a la secuencia de la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) homóloga al hemisitio izquierdo de dicho sitio diana conocido más la secuencia separadora y se denomina "secuencia de hemisitio 1", y en el que la segunda secuencia sintética corresponde a la secuencia separadora más la secuencia de la secuencia diana asimétrica de la etapa (a) homóloga al hemisitio derecho y se denomina "secuencia de hemisitio 2";
- 15
- (c) determinar los nucleótidos dentro de las secuencias sintéticas de la etapa (b) que se desvían de las secuencias homólogas de hemisitio izquierdo y hemisitio derecho correspondientes del sitio diana homólogo conocido de la etapa (a);
- 20
- (d) generar un primer subconjunto de dos secuencias diana basándose en las secuencias sintéticas de la etapa (b), en el que la primera secuencia diana en el primer subconjunto comprende una repetición invertida constituida por la secuencia de hemisitio 1 de la etapa (b) y de la secuencia del hemisitio 1' separadas por la secuencia separadora, y en el que la segunda secuencia diana en el primer subconjunto comprende una repetición invertida constituida por la secuencia de hemisitio 2' y la secuencia del hemisitio 2 de la etapa (b) separada por la secuencia separadora, en el que las secuencias de hemisitio 1' y 2' representan las repeticiones invertidas de las secuencias de hemisitio 1 y 2 respectivas de la etapa (b);
- 25
- (e) generar un segundo subconjunto de secuencias diana basándose en las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d), en el que cada una de las secuencias de hemisitio junto con la secuencia separadora respectiva de las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d) se utiliza para generar una secuencia diana independiente del segundo subconjunto formando una repetición invertida basándose en la secuencia de hemisitio seleccionada, de modo que la secuencia separadora separe ambas secuencias formando la repetición invertida, en el que las secuencias de ambas secuencias de hemisitio que se originan a partir de una de las secuencias diana en el primer subconjunto de la etapa (d) se alteran durante su síntesis y antes de utilizar las mismas para generar la repetición invertida proporcionando la secuencia diana completa de manera que en la secuencia de hemisitio izquierdo una parte de los nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homólogo correspondiente del sitio diana conocido de la etapa (a) se sustituye por los nucleótidos naturales encontrados en el sitio diana conocido y en la secuencia del hemisitio derecho el resto de los nucleótidos que se desvían del hemisitio izquierdo homólogo correspondiente se sustituye por los nucleótidos naturales encontrados en el sitio diana conocido, de modo que en ambas secuencias de hemisitio que se originan a partir de una secuencia diana del primer subconjunto de la etapa (d) de manera conjunta todos los nucleótidos que se desvían pueden encontrarse, en tanto que ninguna de dichas secuencias de hemisitio solas comprenden todos los nucleótidos que se desvían;
- 30
- (f) generar subconjuntos adicionales de secuencias diana partiendo de las secuencias diana en el segundo subconjunto obtenido en la etapa (e) repitiendo paso a paso el procedimiento de la etapa (e) cada vez que se genera un nuevo subconjunto de secuencias diana, hasta que las secuencias de hemisitio que forman las repeticiones invertidas dentro de cada secuencia diana generada contengan uno, dos o tres nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homólogo correspondiente del sitio diana conocido;
- 35
- (g) aplicar la evolución molecular dirigida a la recombinasa que reconoce el sitio diana homólogo conocido seleccionado en la etapa (a) utilizando las secuencias diana del subconjunto final obtenido en la etapa (f) que contienen uno, dos o tres nucleótidos que se desvían de la secuencia de hemisitio homóloga correspondiente de dicho sitio diana homólogo conocido como sustrato;
- 40
- (h) mezclar los bancos de recombinasa desarrollados en la etapa (g);
- 45
- (i) aplicar la evolución molecular dirigida en el banco mezclado obtenido en la etapa (h) utilizando las secuencias diana del subconjunto superior siguiente según la etapa (f);
- 50
- (j) repetir las etapas (h) e (i) hasta que se consiga por lo menos una recombinasa por evolución molecular dirigida que sea activa en la secuencia diana asimétrica dentro de la LTR del ADN retrovírico de la etapa (a);
- 55
- 60
- 65

- (k) aislar el ácido nucleico de por lo menos una recombinasa obtenida en la etapa (j) procedente del banco; y
- (l) clonar el ácido nucleico obtenido en la etapa (k) en un vector de expresión adecuado.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la recombinasa conocida cuya secuencia diana se utiliza en la etapa (a) y en la que se aplica la evolución molecular dirigida en las etapas (g) e (i) pertenece a la familia de serina integrasas o tirosina integrasas, en el que la recombinasa se selecciona preferentemente de entre el grupo constituido por Cre del fago P1, FLP de levadura y Dre del fago D6.
- 10 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la secuencia diana asimétrica identificada en la etapa (a) está situada tanto en el 5'-LTR como en el 3'-LTR del provirus.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el ADN provírico insertado en el genoma de una célula hospedadora es el ADN de un retrovirus seleccionado de entre el grupo constituido por el virus de tumor de mama de ratón (VTMR), virus de mono de Mason Pfizer (VMMP), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo I (VLTH-I), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo II (VLTH-II), virus de la leucemia de linfocitos T de simio tipo I (VLTS-I), virus de la leucemia de linfocitos T de simio tipo II (VLTS II), virus de la leucemia bovina (VLB), virus de la leucemia felina (VLF_e) y virus de la leucemia murina de Moloney (VLM_{Mo}) en el que el retrovirus es preferentemente un lentivirus seleccionado de entre el grupo constituido por virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), virus Maedi-visna (VMV), virus de la anemia equina infecciosa (VAEI) y virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC).
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la secuencia diana asimétrica identificada en la etapa (a) está situada tanto en el 5'-LTR como en el 3'-LTR de un VIH provirus y presenta preferentemente la secuencia expuesta como SEC ID nº 3.
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la evolución molecular dirigida utilizada es la evolución de proteína unida al sustrato.
- 30 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector de expresión utilizado en la etapa (1) se selecciona de entre el grupo constituido por vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores de espumavirus y vectores adenovíricos preferentemente un vector lentivírico seleccionado de entre el grupo constituido por vectores lentivíricos procedentes de VIH-1, VIS, VIF o VAEI.
- 35 8. Procedimiento para la preparación de una recombinasa adaptada, en el que dicho procedimiento comprende el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y la etapa adicional que consiste en expresar la recombinasa adaptada o un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la recombinasa adaptada del ácido nucleico que codifica la recombinasa insertada en el vector de expresión en una célula hospedadora adecuada, en el que la célula hospedadora se selecciona preferentemente de entre el grupo constituido por células bacterianas, células de levadura, células de insectos y células de mamíferos.
- 40 9. Procedimiento para la preparación de una célula madre adulta transformada, en el que dicho procedimiento comprende el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y la etapa adicional de introducción del vector de expresión *in vitro* en una célula madre adulta adecuada.
- 45 10. Ácido nucleico que codifica una recombinasa adaptada, que puede obtenerse por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la recombinasa adaptada recombina secuencias diana asimétricas en el ADN de un provirus insertado en el genoma de una célula hospedadora, que conduce la escisión del provirus desde el genoma de la célula hospedadora, en el que los sitios diana asimétricos son diferentes de los sitios diana de la recombinasa natural, en el que el ácido nucleico presenta por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEC ID nº 2.
- 50 11. Ácido nucleico según la reivindicación 10, en el que dicho ácido nucleico que codifica la recombinasa adaptada presenta la secuencia de ácido nucleico expuesta como SEC ID nº 2.
- 55 12. Vector de expresión que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11.
- 60 13. Recombinasa adaptada que puede obtenerse por el procedimiento según la reivindicación 8, en la que la recombinasa adaptada recombina secuencias diana asimétricas en el ADN de un provirus insertado en el genoma de una célula hospedadora, que conduce a la escisión del provirus desde el genoma de la célula hospedadora, en la que los sitios diana asimétricos son diferentes de los sitios diana de la recombinasa natural, en la que la recombinasa adaptada presenta por lo menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta como SEC ID nº 3.
- 65 14. Recombinasa adaptada según la reivindicación 13, en la que la recombinasa adaptada presenta la secuencia de

aminoácidos expuesta como SEC ID nº 3.

- 5 15. Polipéptido de fusión que comprende una recombinasa adaptada según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, en el que la recombinasa adaptada está unida a un segundo polipéptido.
16. Polipéptido de fusión según la reivindicación 15, en el que el segundo polipéptido comprende un péptido señal, en el que el péptido señal es preferentemente un dominio de transducción de proteínas seleccionado de entre el grupo que comprende el péptido TAT y un péptido de la tercera hélice del homeodominio de Antennapedia.
- 10 17. Célula madre adulta infectada o transfectada con el vector de expresión según la reivindicación 12, en la que dicha célula madre adulta es preferentemente una célula madre del linaje hematopoyético.
- 15 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además la etapa de preparación del vector de expresión, la proteína, la proteína de fusión o la célula madre adulta como composición farmacéutica para la reducción de la carga vírica en un paciente infectado por un retrovirus, en el que la preparación farmacéutica comprende preferentemente además un vehículo, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptables.
- 20 19. Composición farmacéutica para su utilización en la reducción de la carga vírica en un paciente infectado por un retrovirus, que comprende un vector de expresión según la reivindicación 12, una recombinasa adaptada según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, o una célula madre adulta según la reivindicación 17, en la que el retrovirus es preferentemente un retrovirus seleccionado de entre el grupo constituido por el virus de tumor de mama de ratón (VTMR), virus de mono de Mason Pfizer (VMMP), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo I (VLTH-I), virus de leucemia de linfocitos T humanos tipo II (VLTH-II), virus de la leucemia linfocitos T de simio tipo I (VLTS-I), virus de la leucemia de linfocitos T de simio tipo II (VLTS II), virus de la leucemia bovina (VLB), virus de la leucemia felina (VLFe) y virus de la leucemia murina de Moloney (VLMMo) o un lentivirus seleccionado de entre el grupo constituido por virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), virus Maedi-visna (VMV), virus de la anemia equina infecciosa (VAEI) y virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC).
- 25 30 20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19, en la que la composición farmacéutica está destinada a la administración simultánea con otros agentes activos de la terapia antirretrovírica hiperactiva (TARHA) o a la administración simultánea o posterior a la terapia global de activación inmunitaria o de activación específica de la expresión génica del provirus.
- 35 21. Colección de recombinasas adaptadas, en la que los miembros de dicha colección se obtienen cada uno por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la colección comprende el vector de expresión según la reivindicación 12.

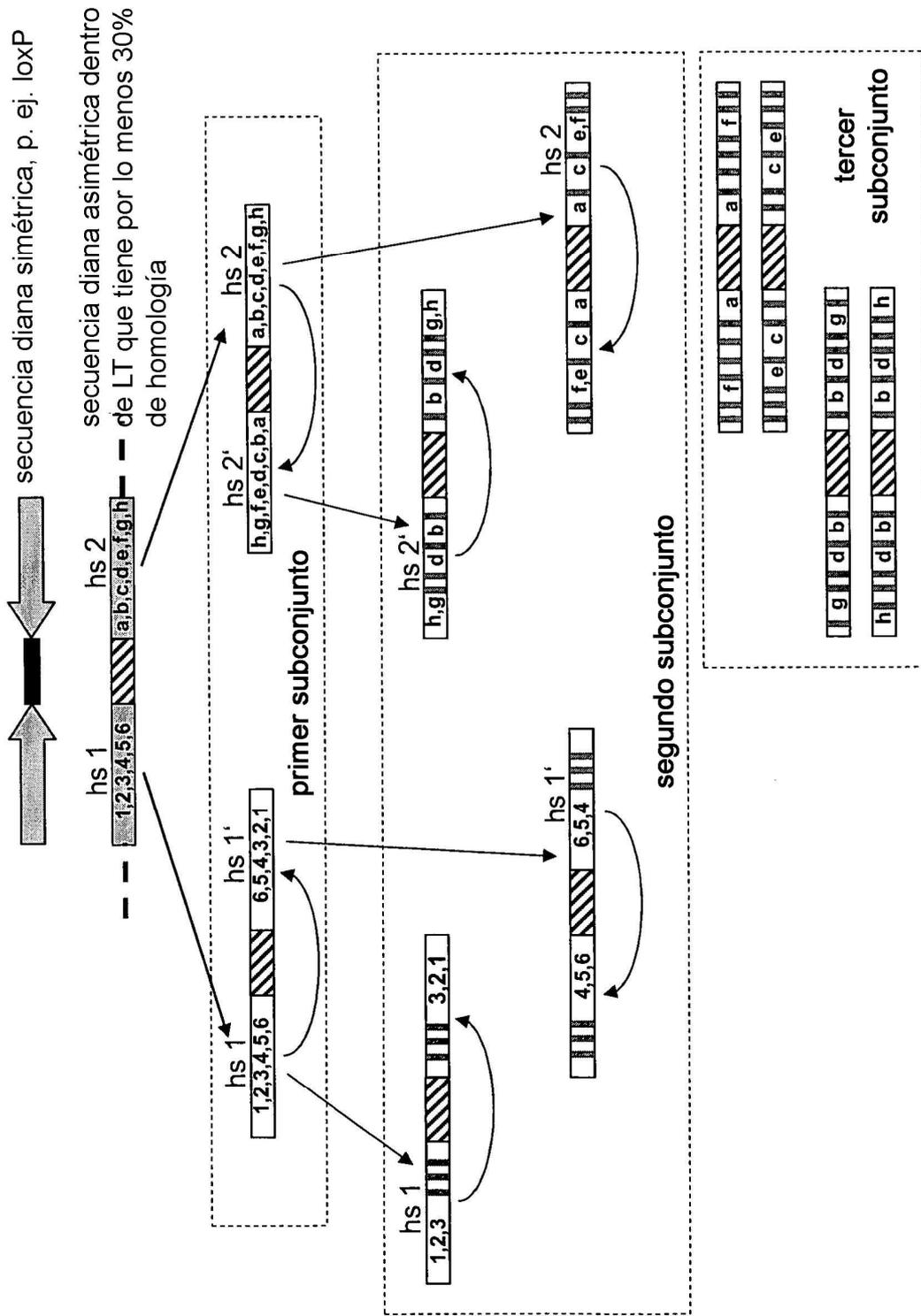


Figura 1

A

ATAACTTCGTATA	ATGTATGC	TATACGAAGTTAT	LoxP
ACAACATCCTATT	ACACCCTA	TATGCCAACATGG	LoxLTR
ACAACATCCTATT	ACACCCTA	AATAGGATGTTGT	LoxLTR1
ACAACATCGTATA	ACACCCTA	TATACGATGTTGT	LoxLTR1a
ATAACTTCCTATT	ACACCCTA	AATAGGAAGTTAT	LoxLTR1b
CCATGTTGGCATA	ACACCCTA	TATGCCAACATGG	LoxLTR2
CCATCTTCGTATA	ACACCCTA	TATACGAAGATGG	LoxLTR2a
ATAAGTTGGCATA	ACACCCTA	TATGCCAAGTTAT	LoxLTR2b

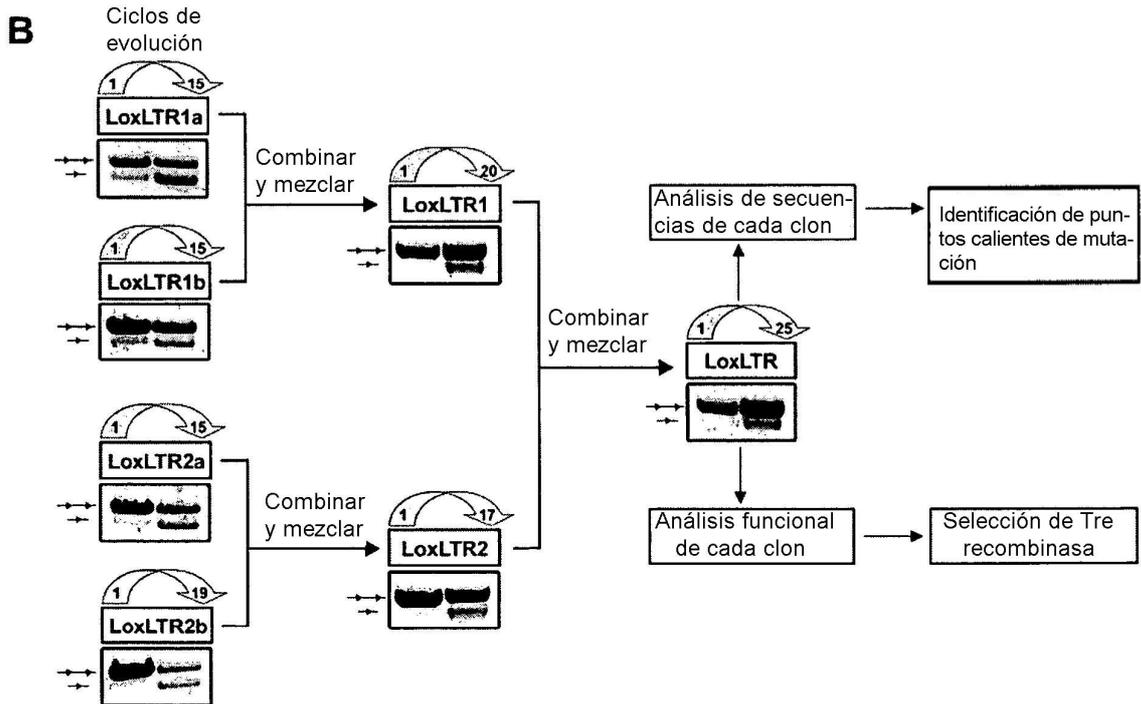


Figura 2

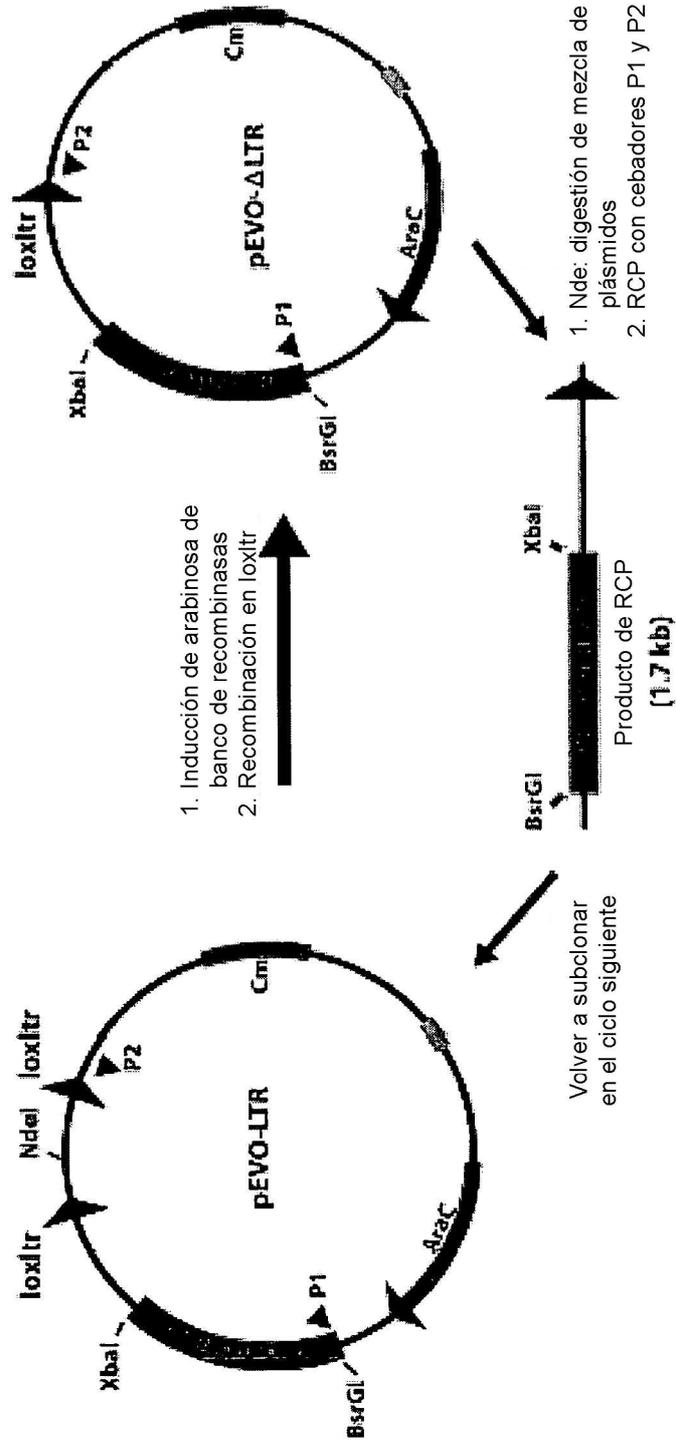


Figura 3

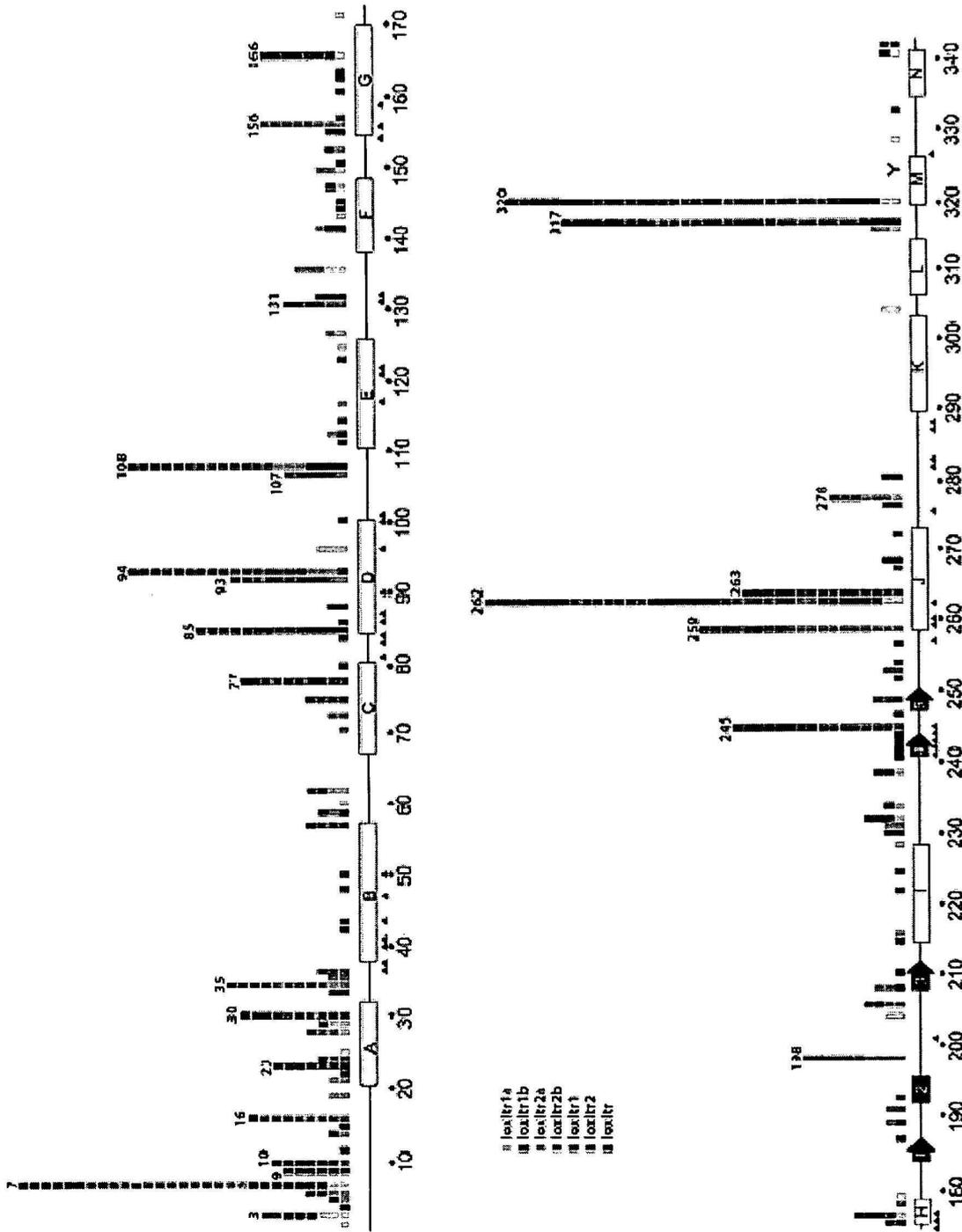


Figura 4

M V P K K K R K V S N L L T ⁷ **U** H ⁹ **H** ¹⁰ **S** L P A L P
¹⁶ **A** D A T S D E V R K N L M D ³⁰ **V** F R D R ³⁵ **P** A P S
 E H T W ⁴³ **E** M L L S V C R S W A A W C K L N N
 R K W P P A E P E D V R D Y L L ⁷⁷ **E** L Q A R G L
 A V K T I Q Q H L ⁹³ **C** ⁹⁴ **R** L N M L H R R S G L P R
 P S D S N A V S L V M R R I R K E N V D A G E
¹³¹ R **I** K Q A L A P E R T D F D Q V R S L M E N S
 D R C Q D I R N L A F L G ¹⁶⁶ **V** A Y N T L L R I A
 E I A R I R V K D I S R T D G G R M L I H I G R
 T K T L V S T A G V E K A L S L G V T K L V E
 R W I S V S G V A D D P N N Y L P C R V R ²⁴⁴ **I** ²⁴⁵ **I**
 G V A A P S A T S Q L S T ²⁵⁹ **I** A L ²⁶² **E** ²⁶³ **R** I P E A T
 H R L I Y G A K D D S G Q R Y L A W S G H S A
 R V G A A R D M A R A G V S I P E I M Q A G G
³¹⁷ W T **I** ³²⁰ **E** V M N Y I R N L D S E T G A M V R
 L L E D G D • •

Figura 5

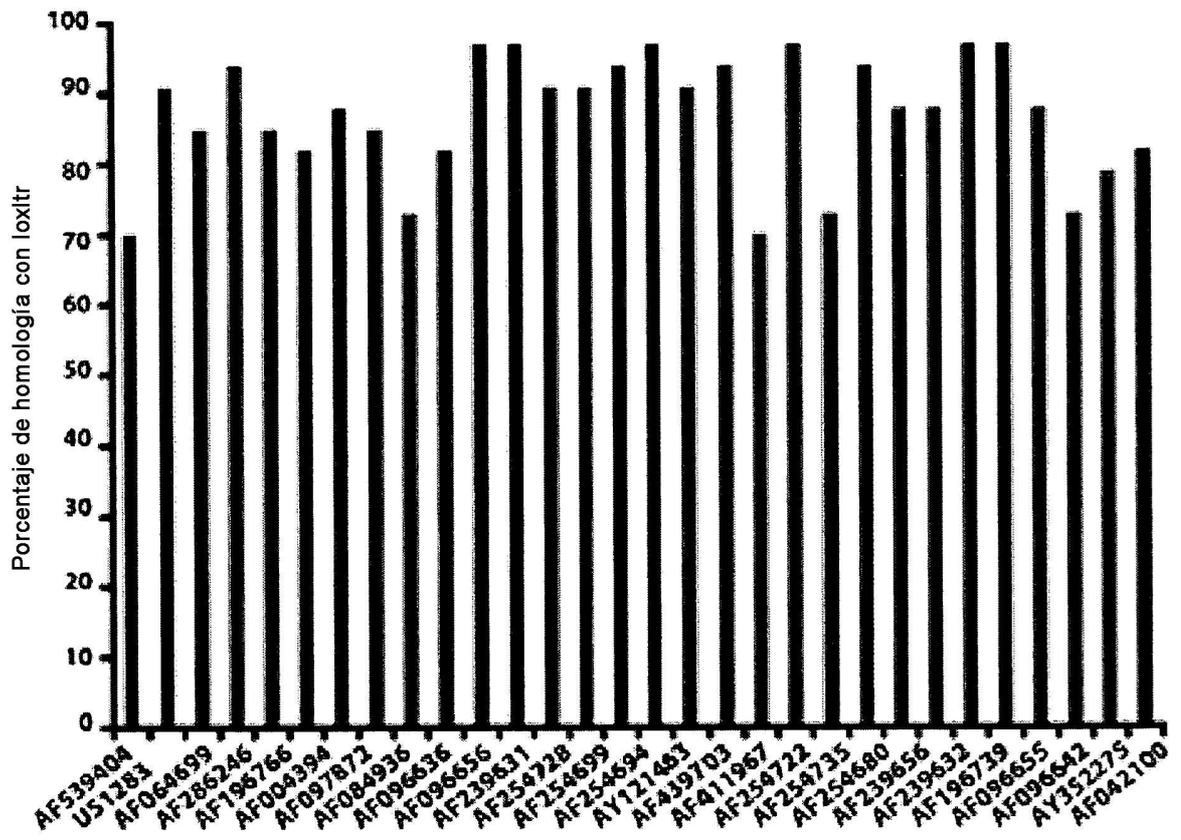


Figura 6

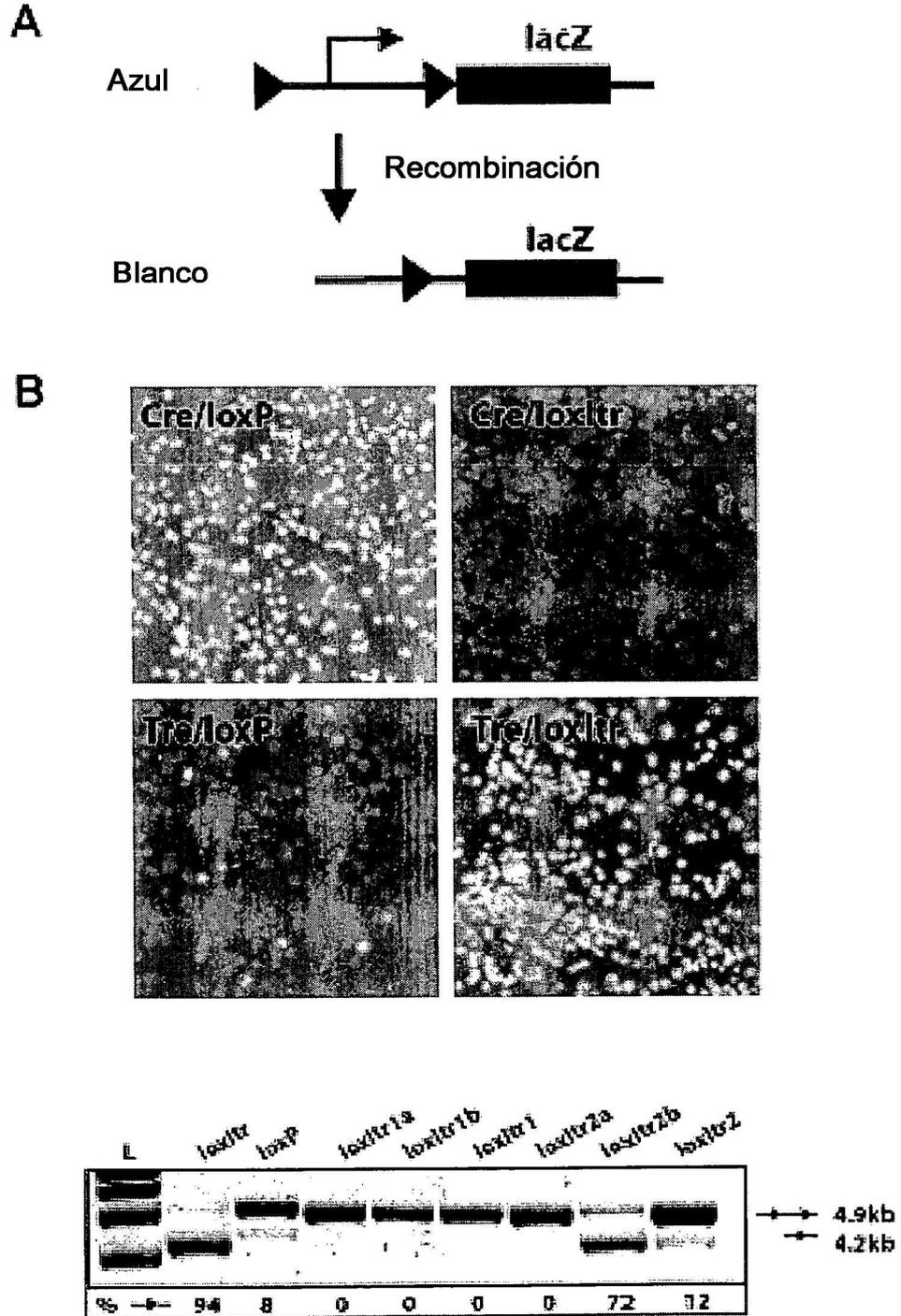


Figura 7

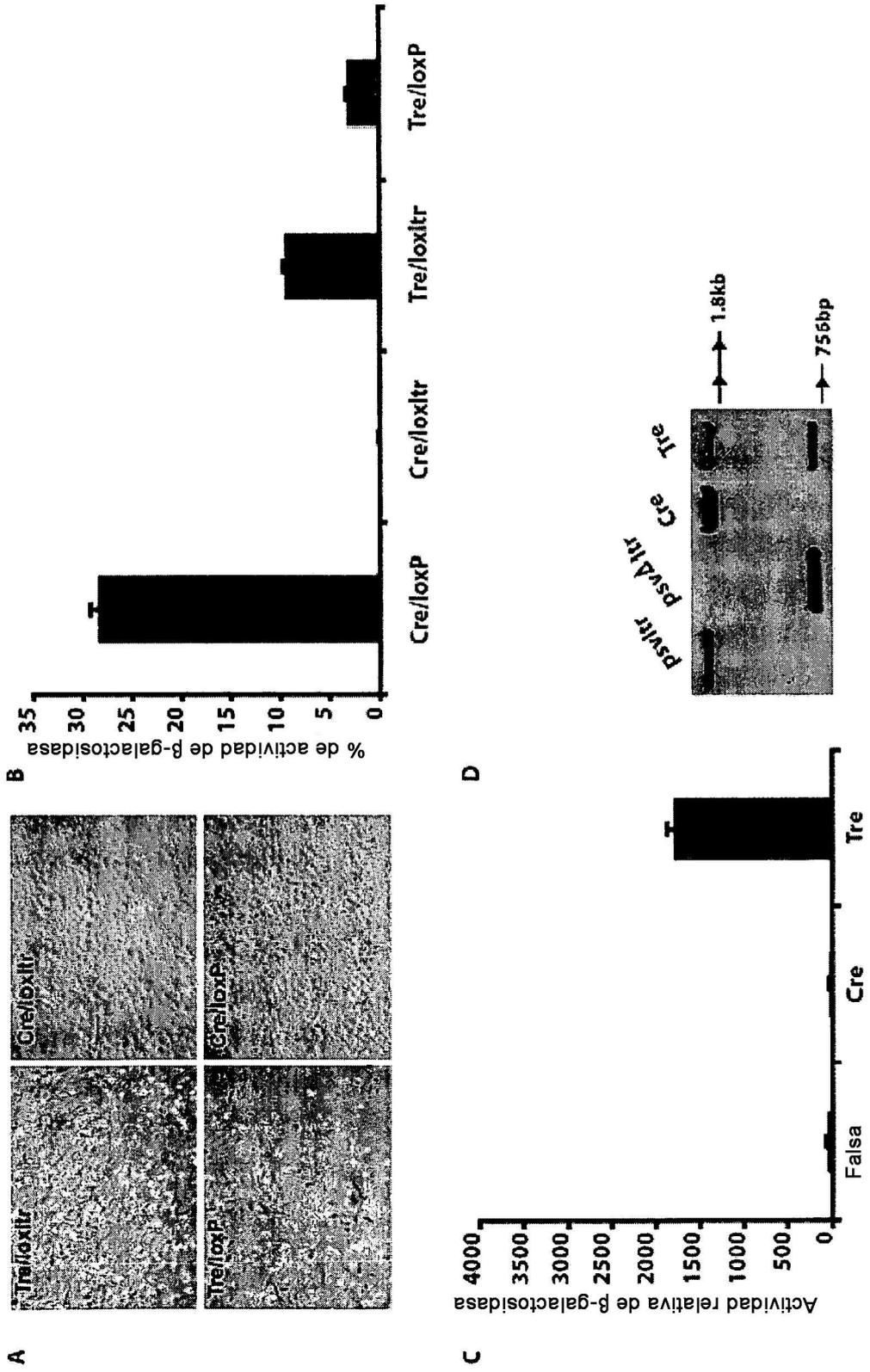


Figura 8

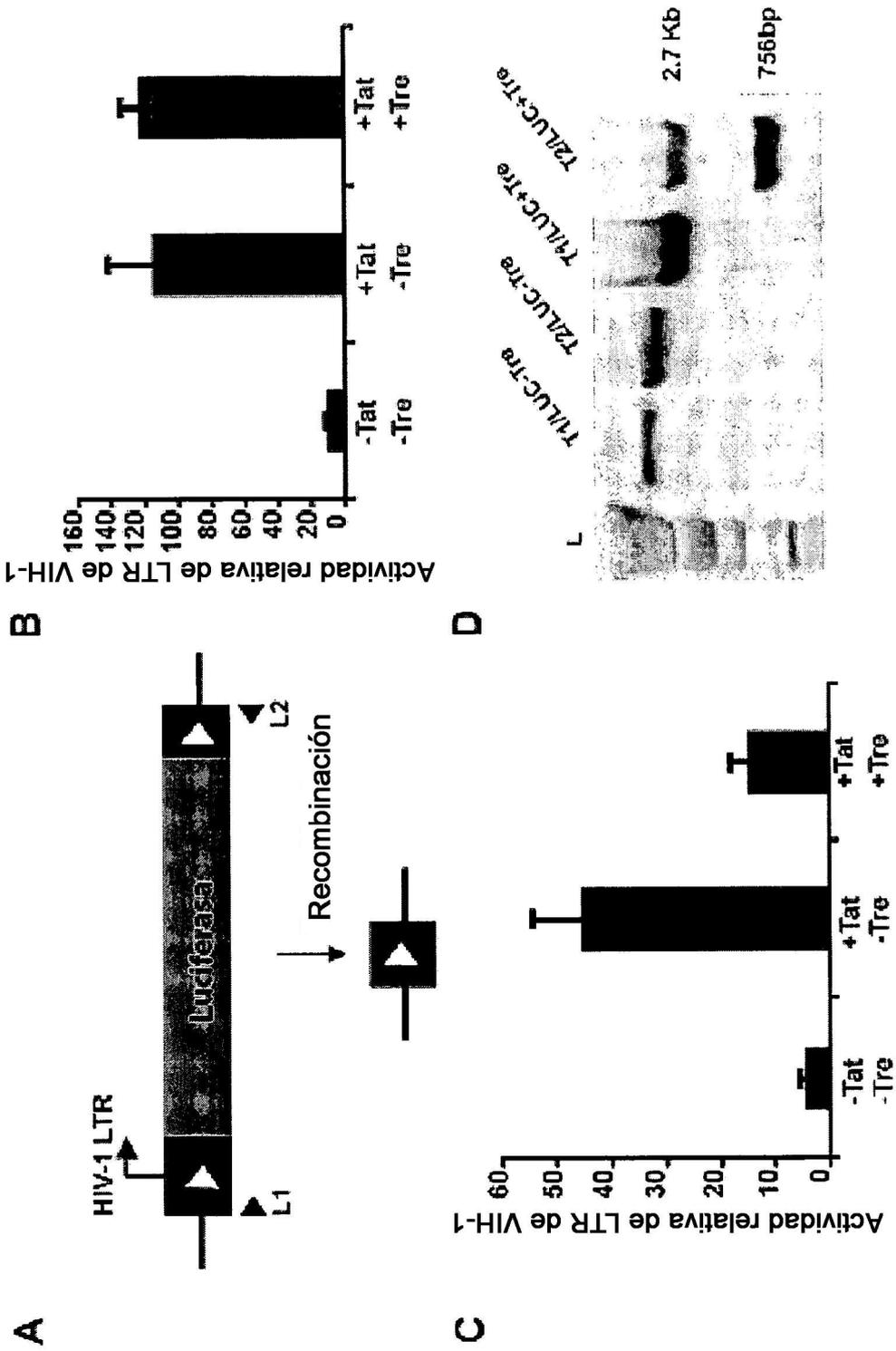


Figura 9

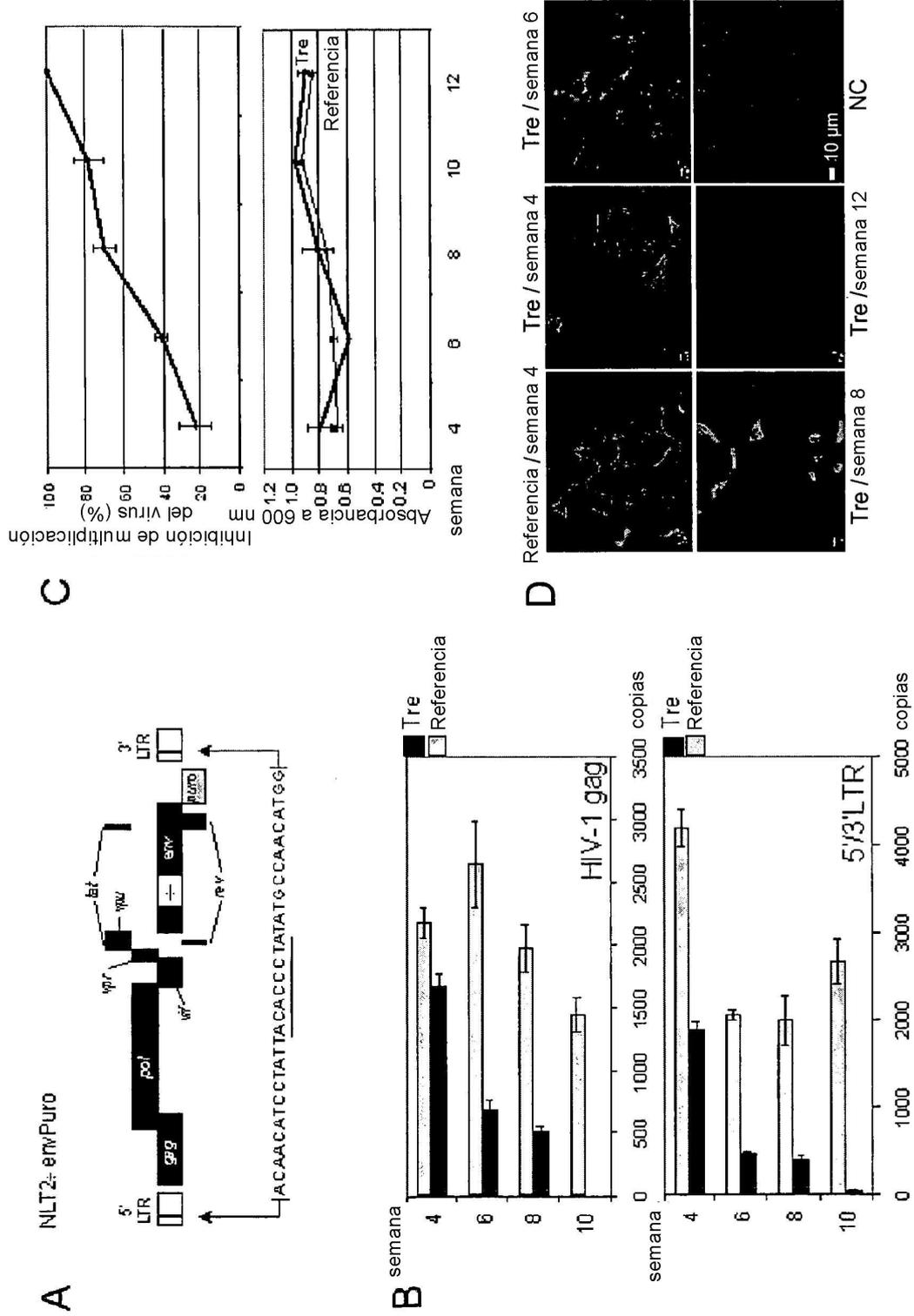


Figura 10

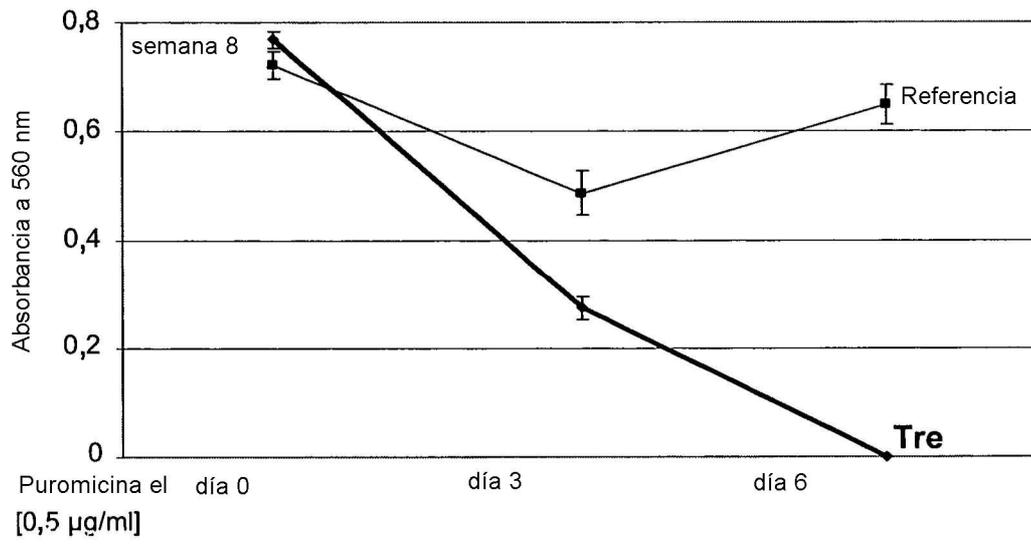


Figura 11