

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 991**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**A61K 35/76** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12R 1/92** (2006.01)

**C12R 1/91** (2006.01)

**C12N 15/867** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2001 E 01936834 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1291419**

54 Título: **Vector retroviral seudotipo que contiene proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina**

30 Prioridad:

**01.06.2000 JP 2000169090**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**22.11.2013**

73 Titular/es:

**DNAVEC RESEARCH INC. (100.0%)  
25-11 Kannondai 1-chome Tsukuba-shi  
Ibaraki 305-0856, JP**

72 Inventor/es:

**YONEMITSU, YOSHIKAZU;  
NAKAJIMA, TOSHIHIRO;  
NAKAMARU, KENJI;  
KOBAYASHI, MASANORI;  
HASEGAWA, MAMORU;  
UEDA, YASUJI;  
IIDA, AKIHIRO y  
SAKAKIBARA, HIROYUKI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 430 991 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Vector retroviral seudotipo que contiene proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina

### Campo técnico

La presente invención se refiere a vectores virales seudotipo que contienen la proteína HN de paramixovirus.

### 5 Técnica anterior

Los vectores retrovirales se han utilizado para expresar genes foráneos en células diana para investigación, terapia génica, etc. Los vectores retrovirales se pueden producir con un método relativamente simple, y también tienen algunas ventajas, como por ejemplo, para introducir genes foráneos en los cromosomas del anfitrión. Normalmente, las proteínas virales localizadas en la envoltura viral juegan un papel crucial en la infección por el vector retroviral. Se ha invertido mucho esfuerzo para ampliar la gama de células anfitrionas a las que los vectores pueden infectar o para desarrollar vectores virales que infectan solamente células específicas mediante la modificación de las proteínas de la envoltura del vector retroviral.

Por ejemplo, se ha desarrollado un sistema en el que se integra la proteína VSV-G en la envoltura del vector retroviral para asegurar la infectividad de una gama más amplia de células anfitrionas (H. Yu et al, 1999, Gene Therapy, 6, 1876 - 1883). La VSV-G es una proteína expresada en la superficie de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular, que es infeccioso para una gama considerablemente amplia de células anfitrionas. Además, por ejemplo, proteína F del virus Sendai se ha utilizado como una proteína de envoltura a modo de experimento. Se encontró que un retrovirus seudotipado con la proteína F mostraba una infectividad específica para las células positivas para el receptor asialoglicoproteínas (M. Spiegel et al, 1998, Hepatology, 28, 1429-1429; M. Spiegel et al, 1998, J. Virology, 72, 5296 a 5302).

Sin embargo, estos retrovirus seudotipo convencionales tienen solo infectividad insuficiente para diversos tejidos y células. Por ejemplo, una variedad de células pluripotenciales, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas pueden ser células diana importantes en la terapia génica o similar (Y. Hanazono, Molecular Medicine, vol. 36, Núm. 7, 1999), pero la mayoría de las células pluripotenciales se encuentran en estado de no división (Abkowitz, J. L. et al., Nat. Med., 2 (2), 190-7, 1996). En general, resulta difícil introducir genes utilizando el vector retroviral que muestra una baja infectividad contra tales células que no están en división. Además, el sistema vector que utiliza técnicas convencionales ha fracasado al introducir genes en células con abundante matriz extracelular tales como células epiteliales de la mucosa de las vías respiratorias pulmonares. Un método para introducir genes en estos tipos de células requiere la eliminación física de la matriz extracelular, por ejemplo el moco, mediante lavado. Sin embargo, este método es complicado y los tejidos se pueden dañar.

### Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar vectores retrovirales seudotipo que contienen proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina.

Los autores de la presente invención seleccionaron proteínas que tenían actividad hemaglutinina como proteínas para retrovirus seudotipo. La hemaglutinina (HAin) es una proteína que induce la hemaglutinación (HA; aglutinación de eritrocitos), y se sabe que diversos virus tienen esta actividad. Los autores de la presente invención consideraron que se podría construir un vector retroviral susceptible de transferencia génica de alta eficacia para diferentes tipos de células y tejidos basado en un retrovirus con una envoltura que contuviera proteínas de membrana con actividad hemaglutinina. Con el fin de construir tal retrovirus, los autores de la presente invención utilizaron proteínas de la envoltura de paramixovirus que tenían una amplia gama de anfitriones. En primer lugar, basándose en un vector que expresaba la proteína de la envoltura del virus Sendai (SeV), se seudotipó un vector viral derivado de un retrovirus de ratón con proteína F y/o HN de SeV. Específicamente, utilizando virus de células pluripotenciales murinas (MSCV) como material de partida, se construyó un retrovirus para que tuviera las proteínas F y/o HN de SeV además de la proteína de la envoltura ecotrópica o la proteína de la envoltura anfotrópica; el vector resultante se sometió a ensayo para determinar la eficacia de la transferencia génica a células humanas (Ejemplos 1 y 2).

Cuando se llevó a cabo el empaquetamiento utilizando la proteína de la envoltura ecotrópica que no mostraba la infectividad para las células humanas, no se consiguió la transferencia génica a las células humanas con el virus seudotipado para la proteína F o la proteína HN solas. Sin embargo, después de haber sido seudotipado mediante la co-expresión de la proteína F y la proteína HN, el virus, que originalmente no tuvo infectividad en células humanas, pudo introducir genes en las células humanas (Eco en la Fig. 1). Este resultado demostró que la gama de anfitriones para la infección del vector viral podría ampliarse mediante seudotipado de un vector derivado de virus distintos del virus Sendai utilizando proteína F y proteína HN del virus Sendai.

Se encontró que, cuando el empaquetamiento se llevó a cabo utilizando la proteína de la envoltura anfotrópica que tenía infectividad para las células humanas, mejoró notablemente la eficacia de la transferencia génica mediante el seudotipado del virus o bien mediante la expresión de la proteína HN sola o bien mediante la co-expresión de la proteína F y la proteína HN (Ampho en la Fig. 1). El resultado demostró que el vector retroviral podría ser por

seudotipado por la proteína HN del virus Sendai sola, y que la eficacia de la transferencia génica del vector retroviral se podía mejorar, o bien mediante pseudotipado utilizando la proteína HN del virus Sendai sola o bien mediante pseudotipado utilizando la proteína F y proteína HN del virus Sendai.

5 Los autores de la presente invención también prepararon un vector retroviral anfotrópico mediante pseudotipado con la proteína HN y determinaron la eficacia de la transferencia génica en células de médula ósea humanas, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas (Ejemplo 3). Se infectaron células de médula ósea humana positivas para CD34 con el vector pseudotipado con la proteína HN, y las células que contenían el gen introducido se fraccionaron mediante citometría de flujo utilizando CD34 como marcador. El resultado demostró que el pseudotipado utilizando la proteína HN mejoró notablemente la eficacia de transferencia génica en células tanto positivas para CD34 como en  
10 células negativas para CD34 (Fig. 3). Se cree que la fracción de células positivas para CD34 contiene células pluripotenciales hematopoyéticas. Por lo tanto, el pseudotipado basado en proteína HN también es útil para la transferencia génica a hemocitos y células hematopoyéticas, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas.

A continuación, utilizando lentivirus que se espera que sea más adecuado como vector para la terapia génica en comparación con otros diversos tipos de retrovirus, los autores de la presente invención construyeron un vector pseudotipado con proteína F y/o proteína HN de paramixovirus. El lentivirus usado es el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) (Ejemplo 5), que ofrece varias ventajas, incluyendo un mayor grado de seguridad cuando se compara con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), comúnmente utilizado en la terapia génica. Las partículas del virus SIV que comprendían la proteína de la envoltura del virus Sendai (SeV) se produjeron preparando virosoma que contenía la envoltura reconstituida a partir de SeV o virus Sendai inactivado y fusionándolos con SIV pseudotipado con la proteína VSV-G. Las partículas de virus se incubaron con células humanas para evaluar la eficacia de la infección del vector (Ejemplos 6 y 7). Los resultados demostraron que el SIV que contenía la envoltura resultante de la fusión con la envoltura de SeV mostraba una mayor infectividad en comparación con SIV pseudotipado con la proteína VSV-G (Fig. 8). El incremento de infectividad fue atribuible a la proteína HN del virus Sendai.  
15

25 Para estimar de modo preciso la contribución de la proteína de la envoltura de SeV, los autores de la presente invención prepararon virosoma de FHN, virosoma de F y virosoma de HN, y prepararon vectores mediante fusión de SIV pseudotipado con VSV-G con cada virosoma. A continuación, se evaluaron los vectores resultantes basándose en experimentos de infección (Ejemplo 7). El vector que se fusiona con el virosoma de FHN mostró una eficacia de transferencia génica significativamente mayor que la de SIV solo (Fig. 10). Con el virosoma de HN, también mejoró la eficacia de la transferencia génica. Sin embargo, a diferencia del virosoma de FHN, la fusión con el virosoma de F no dio lugar a ningún incremento en el nivel de expresión génica. Por lo tanto, se demostró que la proteína HN era importante para aumentar la eficacia de la transferencia génica.  
30

Además, utilizando un vector de expresión con la proteína de la envoltura de SeV, los autores de la presente invención produjeron un vector de lentivirus que se había pseudotipado con proteína de la envoltura de SeV en la fase de empaquetamiento (Ejemplo 8). El vector de SIV pseudotipado con la proteína F y la proteína HN además de la proteína VSV-G se produjo en un título más alto. Este vector viral se pudo enriquecerse adicionalmente mediante centrifugación. Los autores de la presente invención sometieron a ensayo en el vector en un análisis de transferencia génica *in vivo*.  
35

Puesto que los vectores virales convencionales apenas transfieren genes a células de la mucosa del epitelio de la tráquea, se requiere un tratamiento previo para eliminar las barreras físicas para lograr la transferencia génica; por ejemplo, sin dañar las células por medio de dióxido de azufre o similar, no se logra una transferencia génica con una eficacia suficientemente alta por medio de un método de transferencia génica utilizando el vector de VIH pseudotipado con VSV-G (L. G. Johnson et al., Gene Therapy, 7, 568-574, 2000). Los autores de la presente invención sometieron a ensayo si el vector de SIV pseudotipado con proteína VSV-G, y las proteínas F y HN del virus Sendai permitían una transferencia génica eficaz a células de la mucosa del epitelio de la tráquea sin causar tal daño (Ejemplo 9). El vector de SIV pseudotipo mencionado anteriormente para la expresión de GFP se administró por vía intranasal a ratones, y se observó la expresión de la proteína GFP en secciones de tejido de la tráquea 3 días después de la administración; se detectó fluorescencia por GFP en células epiteliales de la tráquea (Fig. 11). Adicionalmente, también fueron detectables señales de fluorescencia resultantes de la expresión de GFP en epitelio de la mucosa de la membrana mucosa septonasal y del epitelio ciliado pseudoestratificado de los mismos individuos (Fig. 12). De este modo, se demostró que el vector viral de la presente invención podría introducir genes en células que tienen moco, tales como células epiteliales de la mucosa, sin dañar las células o tejidos.  
40  
45  
50

Además, los autores de la presente invención construyeron un vector de expresión para una proteína HN modificada en la que se había alterado el dominio citoplásmico. Usando este vector, produjeron un vector viral pseudotipado novedoso. Específicamente, construyeron vectores para expresar una proteína que comprendía el dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de SIV conectado a la proteína HN de SeV; una proteína en la que el dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de SIV había sido sustituido por el dominio citoplásmico de la proteína HN; y la proteína F de VSe en la que la totalidad o una porción del dominio citoplásmico había sido suprimido o reemplazado por el dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de SIV; después, construyeron adicionalmente vectores de SIV pseudotipados que contenían estas proteínas (Ejemplos 11 y 12). Se demostró que estos vectores eran capaces de transferir genes a células humanas, incluyendo células 293T y células BEAS-2B.  
55  
60

Por lo tanto, se encontró que los vectores seudotipados con HN eran capaces de transferir genes a células humanas incluso en ausencia de cualquiera de las otras proteínas de la envoltura coexistentes tales como VSV-G. También se demostró que los vectores retrovirales seudotipo basados en MSCV construidos utilizando estos plásmidos de expresión para proteínas HN modificadas eran capaces de transferir genes a células humanas (Ejemplo 13). El vector de SIV seudotipado que contenía la proteína HN modificada se preparó a gran escala, se enriqueció, y después se permitió que infectara células de médula ósea humana. De acuerdo con este resultado, el vector pudo transferir genes a células de médula ósea CD34<sup>+</sup> con una alta eficacia (Ejemplo 14).

Además, los autores de la presente invención prepararon vectores de lentivirus seudotipados con HA utilizando el vector de expresión para la proteínas hemaglutinina (HA) del virus de la influenza. El virus resultante pudo introducir genes en células humanas y ser altamente enriquecido mediante centrifugación (Ejemplo 16). Además, prepararon vector de lentivirus seudotipado con HA/HN que contenía proteína HA del el virus de la influenza y proteína HN modificada del virus Sendai, y confirmaron que el vector podía transferir genes a células humanas (Ejemplo 17).

Como se ha descrito anteriormente, los autores de la presente invención tuvieron éxito en la construcción de vectores virales que aseguraban una transferencia génica con una elevada eficacia utilizando retrovirus seudotipados con proteínas de membrana que tenían actividad hemaglutinina. Adicionalmente, demostraron que los vectores virales podían transferir genes con una alta eficacia a hemocitos y células hematopoyéticas, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas y células que tenían moco, tales como células epiteliales de la mucosa, en la administración *ex vivo* o *in vivo*.

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. De este modo, en particular, se refiere a un método para producir un vector retroviral seudotipo, comprendiendo el método la etapa de transcribir un ADN de un vector de transferencia génica derivado de retrovirus en una célula de empaquetamiento que comprende ADN que codifica las proteínas HN y F de virus Sendai de una manera expresable, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico para producir un vector retroviral seudotipo que tiene dichas proteínas HN y F.

Por otra parte, también se refiere en particular a un vector retroviral seudotipo que tiene las proteínas HN y F del virus Sendai, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico. Además, también se refiere en particular a una célula de empaquetamiento para producir el vector retroviral seudotipo, comprendiendo la célula, de una manera expresable, ADN que codifica las proteínas HN y F del virus Sendai, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.

Más específicamente, la presente invención se refiere a los siguientes

1. Un método para producir un vector retroviral seudotipo, comprendiendo el método la etapa de transcribir un ADN vector de transferencia génica derivado de retrovirus a una célula de empaquetamiento que comprende ADN que codifica las proteínas HN y F del virus Sendai de una manera expresable, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico para producir un vector retroviral seudotipo que tiene dichas proteínas HN y F.

2. El método de acuerdo con el punto 1, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.

3. El método de acuerdo con el punto 1, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado mediante la adición de o el remplazo por un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura retroviral.

4. El método de acuerdo con el punto 1, en donde la célula de empaquetamiento comprende adicionalmente ADN que codifica la proteína HA de ortomixovirus.

5. El método de acuerdo con el punto 1, en donde la célula de empaquetamiento comprende adicionalmente ADN que codifica una proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas.

6. El método de acuerdo con el punto 5, en donde la proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas es

(a) una proteína de la envoltura anfotrópica derivada de un retrovirus; o

(b) la proteína VSV-G derivada de un virus de la estomatitis vesicular.

7. El método de acuerdo con el punto 1, en donde el vector retroviral deriva de

(a) oncovirus; o

(b) lentivirus.

8. El método de acuerdo con el punto 7, en donde el lentivirus deriva del virus de la inmunodeficiencia de simios.

9. El método de acuerdo con el punto 1, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
10. El método de acuerdo con el punto 1, en donde la proteína HN del virus Sendai ha sido modificada para que comprenda la secuencia del SEQ ID NO: 40 o 41.
- 5 11. El método de acuerdo con el punto 1, en donde la proteína F comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 42.
12. El método de acuerdo con el punto 1, en donde la proteína F ha sido modificada adicionalmente para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
- 10 13. El método de acuerdo con el punto 12, en donde la proteína F del virus Sendai comprende la secuencia del SEQ ID NO: 45.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el vector comprende un gen foráneo de una manera expresable.
15. Un vector retroviral seudotipo que tiene las proteínas HN y F del virus Sendai, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
- 15 16. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
17. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado mediante la adición de o el remplazo por un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura retroviral.
- 20 18. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, comprende adicionalmente la proteína HA de ortomixovirus.
19. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, comprende adicionalmente una proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas.
- 25 20. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 19, en donde la proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas es
- (a) una proteína de la envoltura anfotrópica derivada de un retrovirus; o
- (b) la proteína VSV-G derivada de un virus de la estomatitis vesicular.
21. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, en donde el vector retroviral deriva de
- 30 (a) oncovirus; o
- (b) lentivirus.
22. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 21, en donde el lentivirus deriva del virus de la inmunodeficiencia de simios.
23. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN del virus Sendai ha sido modificado para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
- 35 24. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, en donde la proteína HN del virus Sendai ha sido modificada para que comprenda la secuencia del SEQ ID NO: 40 o 41.
25. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, en donde la proteína F comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 42.
- 40 26. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 15, en donde la proteína F ha sido modificada adicionalmente para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
27. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con el punto 26, en donde la proteína F del virus Sendai comprende la secuencia del SEQ ID NO: 45.
- 45 28. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 27, en donde el vector comprende un gen foráneo de una manera expresable.

29. El uso del vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28, para la preparación de una composición farmacéutica para transferir un gen foráneo a una célula en terapia génica.
30. El uso de acuerdo con el punto 29, en donde la célula es una célula que tiene moco.
31. El uso de acuerdo con el punto 30, en donde la célula que tiene moco es una célula epitelial de la mucosa.
- 5 32. El uso de acuerdo con el punto 31, en donde la célula epitelial de la mucosa es una célula epitelial de la mucosa de la cavidad nasal o del tubo bronquial pulmonar.
33. El uso de acuerdo con el punto 29, en donde la célula es un hemocito o una célula hematopoyética.
34. El uso de acuerdo con el punto 33, en donde el hemocito o la célula hematopoyética es una célula pluripotencial hematopoyética.
- 10 35. Una composición para la transferencia génica, comprendiendo la composición el vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28 para la transferencia génica.
36. La composición de acuerdo con el punto 35, en donde la composición es una composición farmacéutica.
37. Un método in vitro para introducir un gen foráneo en células, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto las células con el vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28.
- 15 38. Una célula de empaquetamiento para producir el vector retroviral seudotipo, comprendiendo la célula, de una manera expresable, ADN que codifica las proteínas HN y F del virus Sendai, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
39. La célula de empaquetamiento de acuerdo con el punto 38, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
- 20 40. La célula de empaquetamiento de acuerdo con el punto 38, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado mediante la adición de o el remplazo por un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura retroviral.
- De este modo, en el contexto de la presente invención, se describen los siguientes apartados (1) a (24):
- 25 (1) un vector retroviral seudotipo sustancialmente puro que comprende una proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina;
- (2) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (1), en donde la proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina deriva de una proteína que tiene actividad hemaglutinina que está contenida en un virus de ARN de cadena negativa de una sola cadena;
- 30 (3) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (2), en donde la proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina deriva de la proteína HN de paramixovirus y/o la proteína HA de ortomixovirus;
- (4) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (2), en donde la proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina es una porción o la totalidad de un dominio citoplásmico de una proteína que tiene actividad hemaglutinina que está contenida en un virus de ARN monocatenario de cadena negativa, y en donde la porción o la totalidad han sido modificadas mediante sustitución, delección, y/o adición;
- 35 (5) el vector retroviral seudotipo acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (3), que comprende adicionalmente la proteína F de paramixovirus;
- (6) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (5), en donde una porción o la totalidad de un dominio citoplásmico de la proteína F han sido modificados mediante delección y/o adición;
- 40 (7) el vector retroviral seudotipo acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (6), que comprende adicionalmente una proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para las células humanas;
- (8) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (7), en donde el vector comprende una proteína de la envoltura anfotrópica derivada de un retroviral;
- (9) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con los apartados (7) u (8), en donde vector comprende proteína VSV-G derivada de un virus de la estomatitis vesicular;
- 45 (10) el vector retroviral seudotipo acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (9), en donde el vector retroviral deriva de oncovirus;

- (11) el vector retroviral seudotipo acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (9), en el que el vector retroviral deriva de lentivirus;
- (12) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (11), en donde el lentivirus deriva del virus de la inmunodeficiencia de simios;
- 5 (13) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con los apartados (3) o (5), en donde el paramixovirus es el virus Sendai;
- (14) el vector retroviral seudotipo acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (13), en donde el vector comprende un gen foráneo de una manera expresable;
- 10 (15) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (14), en donde el vector se utiliza para transferir genes a una célula que tiene moco;
- (16) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (15), en donde la célula que tiene moco es una célula epitelial de la mucosa;
- (17) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (16), en donde la célula epitelial de la mucosa es una célula epitelial de la mucosa de la cavidad nasal o del tubo bronquial pulmonar;
- 15 (18) el vector retroviral de acuerdo con seudotipo (14), en donde el vector se utiliza para transferir genes a un hemocito o una célula hematopoyética;
- (19) el vector retroviral seudotipo de acuerdo con el apartado (18), en donde el hemocito o célula hematopoyética es una célula pluripotencial hematopoyética;
- 20 (20) una composición para la transferencia génica, comprendiendo la composición el vector retroviral seudotipo acuerdo con uno cualquiera de los apartados (14) a (19);
- (21) la composición de acuerdo con el apartado (20), en donde la composición es una composición farmacéutica;
- (22) un método para introducir un gen foráneo en células, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto las células con el vector retroviral seudotipo de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (14) a (19);
- 25 (23) una célula de empaquetamiento para producir el vector retroviral seudotipo de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (19), comprendiendo la célula, de una manera expresable, un ADN que codifica una proteína que tiene actividad hemaglutinina; y
- (24) un método para producir el vector retroviral seudotipo acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (19), comprendiendo el método la etapa de transcribir un ADN vector para la transferencia de un gen derivado de retrovirus en la célula de empaquetamiento de acuerdo con el apartado (23).
- 30 El vector retroviral descrito en la presente memoria es un vector retroviral seudotipo sustancialmente puro seudotipado con una proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina. Según se utiliza en la presente memoria, el término "vector viral" hace referencia a una partícula viral capaz de transferir moléculas de ácido nucleico a un anfitrión. El término "vector retroviral" hace referencia a un vector que comprende la cadena principal de retrovirus. El término "que tiene la cadena principal de retrovirus" significa que las moléculas de ácido nucleico de la partícula viral que constituye el vector se basan en el genoma de un retrovirus. Por ejemplo, un vector en el que las moléculas de ácido nucleico en la partícula de virus contienen la secuencia de señal de empaquetamiento derivada del genoma de un retrovirus es uno de los vectores retrovirales de la presente invención.
- 35 El término "vector retroviral seudotipado con proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina" hace referencia a un vector retroviral que contiene una o más proteínas de membrana con actividad hemaglutinina que no están contenidas en la contraparte natural. Según se utiliza en la presente memoria, el término "vector retroviral seudotipo sustancialmente puro" significa que dicho vector retroviral seudotipo no porta sustancialmente virus replicativos no retrovirales que tiene actividad hemaglutinina. Un vector retroviral seudotipo preferido de la presente invención es un vector que no porta sustancialmente ningún virus replicativo no retroviral. El término "replicativo" significa que un virus se replica y produce partículas virales infecciosas en una célula anfitriona en la que se ha infectado el vector viral. Por ejemplo, en las células en las que se ha infectado el vector retroviral seudotipo, cuando el título de HA que representa la actividad hemaglutinina (aglutinación de eritrocitos) después de la infección por el vector no es significativamente elevado en comparación con el de la fase temprana de la infección, se puede evaluar que el vector no tiene sustancialmente virus replicativo que contiene proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina.
- 40 El término "vector retroviral seudotipado con proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina" hace referencia a un vector retroviral que contiene una o más proteínas de membrana con actividad hemaglutinina que no están contenidas en la contraparte natural. Según se utiliza en la presente memoria, el término "vector retroviral seudotipo sustancialmente puro" significa que dicho vector retroviral seudotipo no porta sustancialmente virus replicativos no retrovirales que tiene actividad hemaglutinina. Un vector retroviral seudotipo preferido de la presente invención es un vector que no porta sustancialmente ningún virus replicativo no retroviral. El término "replicativo" significa que un virus se replica y produce partículas virales infecciosas en una célula anfitriona en la que se ha infectado el vector viral. Por ejemplo, en las células en las que se ha infectado el vector retroviral seudotipo, cuando el título de HA que representa la actividad hemaglutinina (aglutinación de eritrocitos) después de la infección por el vector no es significativamente elevado en comparación con el de la fase temprana de la infección, se puede evaluar que el vector no tiene sustancialmente virus replicativo que contiene proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina.
- 45 La proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina puede ser una proteína de origen natural o una proteína artificial; se prefiere que la proteína tenga actividad hemaglutinina viral. Se ha informado de que varios tipos de virus tienen actividad hemaglutinina. El tipo de eritrocito y la temperatura de reacción óptima que se van a utilizar para la detección de la actividad hemaglutinina dependen del tipo de virus específico. También se ha informado de que en el
- 50

caso del virus de la rubéola la reacción requiere la presencia de iones calcio. En el caso de los arbovirus, el pH óptimo de la reacción se encuentra en un intervalo muy estrecho. La hemaglutinina viral está presente en el propio virión en enterovirus o virus de la rubéola, o está presente en partículas más pequeñas, así como en el virión en arbovirus, adenovirus, etc. La hemaglutinina de virus de la viruela está presente en forma de una partícula distinta de un virión que contiene lípidos. El retrovirus pseudotipo de la presente invención puede contener tales proteínas. Los adenovirus de tipo III aglutinan parcialmente eritrocitos de rata, lo que da como resultado una aglutinación incompleta; tales proteínas también se pueden utilizar como proteínas de membrana que tiene actividad hemaglutinina.

La actividad hemaglutinina (aglutinación de eritrocitos; título de HA) se puede someter a ensayo mediante un método conocido en la técnica (The society of reseach associates of The National Institute of Health, Eds., General Experimental Virology, 2ª Ed., págs. 214-225, MARUZEN CO.). Los eritrocitos incluyen, por ejemplo, los de pollo (incluyendo pollo y aves de corral), ganso, rata, cobaya, mono rhesus, mono verde y ser humano. La temperatura de reacción puede ser de 0°C, 4°C, temperatura ambiente, 37°C, o similar, dependiendo del tipo de proteína. Las condiciones ilustrativas de la reacción de aglutinación de eritrocitos de los respectivos virus se muestran a continuación:

Tabla 1

Clase de virus			Reacción HA		
			Eritrocito	Temperatura	pH
Adeno	Tipo I	3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25, 28	Mono Rhesus	37°C	Independiente
	Tipo II	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27	Rata		
	Tipo III	1, 2, 4, 5, 6	Agglutinación incompleta Rata		
Entero	Coxsackie	A 7	Pollo	Temperatura ambiente	Independiente
		A 20, 21, 24	Tipo O humano	4°C	
		B1, 3, 5		37°C	
	Eco	3, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 20, 21, 24, 29		4°C	
Reo	1		Tipo O humano	Temperatura ambiente	Independiente
	2				
	3		Ganado		
Mixo	Influenza	A	Pollo, humano o cobaya	Temperatura ambiente	7,2
		B			
		C	Pollo	4°C	
	Paperas		Pollo	Temperatura ambiente	Independiente
	Enfermedad de Newcastle (NDV)				
	Para-influenza	1	Pollo o humano	4°C	
		2	Pollo		
3		Humano o cobaya	4°C o temperatura ambiente.		
Sarampión		Mono verde	37°C		
Arbo			Ganso o pollo	37°C	
Rabdo	Rabia		Ganso	0°C	estrictamente 6,4
	Estomatitis vesicular (VSV)				estrictamente 5,8
Viruela	Vaccinia, Variola		Pollo	Temp. ambiente o 37°C	Independiente



Clase de virus	Reacción HA		
	Eritrocito	Temperatura	pH
Rubéola	Pollo o ganso	4°C	6,2 o 7,2
Polioma	Cobaya	4°C	7,2
Rata (RV)	Cobaya	Temperatura ambiente	7,2

Las proteínas de membrana particularmente preferidas que tiene actividad hemaglutinina en el retrovirus seudotipo descritas en la presente memoria son proteínas virales; específicamente, tales proteínas incluyen proteínas HN de paramixovirus; proteínas HA de ortomixovirus y virus de la influenza; proteína E1 togaviral; proteínas A27L, H3L, y D8L de virus vaccinia; proteínas M y E de flavivirus; proteínas E1 y E2 de coronavirus; proteína G1 de bunyavirus, etc. Entre otras, se prefieren las proteínas de virus de ARN monocatenario de cadena negativa, y se prefiere particularmente la proteína HN de paramixovirus, como proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina que va a estar contenida en el retrovirus seudotipo de la presente memoria.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "virus de ARN monocatenario de cadena negativa" hace referencia a un virus cuyo genoma comprende un ARN monocatenario de cadena negativa (es decir, cadena (-)). Tales virus incluyen paramixovirus (Paramyxoviridae, incluyendo el género Paramyxovirus, el género Morbillivirus, el género Rubulavirus, el género Pneumovirus, y similares), rabdovirus (Rhabdoviridae; incluyendo el género Vesiculovirus, el género Lyssavirus, el género Ephemerovirus, y similares), filovirus (Filoviridae), ortomixovirus (Orthomyxoviridae, incluyendo los virus de la influenza A, B, y C, virus de tipo Thogoto, y similares), bunyavirus (Bunyaviridae, incluyendo el género Bunyavirus, el género Hantavirus, el género Nairovirus, el género Phlebovirus, y similares), arenavirus (Arenaviridae), etc.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "paramixovirus" se refiere a un virus perteneciente a la familia de los paramixovirus (Paramyxoviridae). El paramixovirus incluye, por ejemplo, virus Sendai, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de las paperas, virus del sarampión, virus RS (virus sincitial respiratorio), virus de la peste bovina, virus del moquillo, virus de la parainfluenza mono (SV5), los tipos 1, 2 y 3 del virus de la parainfluenza humana, etc. El virus Sendai incluye cepas de tipo salvaje, cepas mutantes, cepas de laboratorio, cepas construidas artificialmente, etc. También se pueden utilizar virus incompletos, tales como partículas DI (J. Virol. 68, 8413 – 8417 (1994)), oligonucleótidos sintetizados, etc. como material para producir las vacunas de la presente invención. La proteína HN es una proteína de virus paramixovirus. Los genes conocidos que codifican proteínas virales de paramixovirus incluyen los genes NP, P, M, F, HN, y L. Los "genes NP, P, M, F, HN y L" de virus pertenecientes a la familia Paramyxoviridae se corresponden con los genes que codifican las proteínas de la nucleocápsida, fosfo, matriz, fusión, hemaglutinina-neuraminidasa y grande. Los genes respectivos de los virus que pertenecen a las subfamilias de la familia Paramyxoviridae están representados en general como sigue. El gen NP se describe generalmente también como "gen N".

Género Paramyxovirus	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
Género Rubulavirus	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
Género Morbillivirus	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

Los números de acceso de la base de datos para las secuencias de nucleótidos de los genes del virus Sendai clasificados en Paramyxovirus de la familia Paramyxoviridae son, M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046 y X17218 para el gen NP, M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007 y X17008 para el gen P, D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584 y X53056 para el gen M, D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152 y X02131 para el gen F, D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808 X56131 y para el gen HN, y D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587 y X58886 para el gen L.

Según se describe en la presente memoria en los Ejemplos, se puede producir un vector retroviral seudotipado con proteínas de la envoltura paramixoviral preparando paramixovirus inactivado, virosoma que tiene la proteína de la envoltura de paramixovirus, etc. y fusionándolo con retrovirus. El vector también se puede producir expresando un vector de expresión para las proteínas de la envoltura de paramixovirus en células de empaquetamiento de retrovirus.

El vector retroviral seudotipo descrito en la presente memoria puede comprender, por ejemplo, la proteína F de paramixovirus además de las proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina tales como la proteína HN de paramixovirus. La presente invención demostró que el vector retroviral seudotipo que contenía las proteínas HN y F mostraba una alta eficacia de transferencia génica. Los vectores retrovirales seudotipo que contienen las proteínas

F y HN están dentro del alcance de la presente invención. El vector retroviral seudotipo descrito en la presente memoria puede contener adicionalmente la proteína M de paramixovirus.

Además, el vector retroviral seudotipo descrito en la presente memoria puede contener adicionalmente proteínas de la envoltura derivadas de otros virus. Por ejemplo, las proteínas de la envoltura preferidas incluyen las derivadas de virus infecciosos para las células humanas. Tales proteínas incluyen, pero no están limitadas a, proteínas de la envoltura anfotrópica de retrovirus, proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), etc. Tales proteínas de virus pertenecientes a herpesviridae incluyen, por ejemplo, las proteínas gB, gD, gH y gp85 de virus del herpes simple, las proteínas gp350 y gp220 del virus EB, etc. Tales proteínas de virus que pertenecen a hepadnaviridae incluyen la proteína S del virus de la hepatitis B, etc.

Por ejemplo, se prefiere un vector que comprende proteína de la envoltura anfotrópica retroviral (env anfotrópica) y proteína HN como vector de la presente invención. Alternativamente, por ejemplo, el vector puede contener proteína VSV-G que es una glicoproteína de la superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se ha creído que la VSV-G utilizaba fosfolípido como receptor, que existe en la mayoría de las células animales, y por lo tanto, mediante el uso de un vector que contiene la proteína VSV-G y la proteína HN, la variedad de células en las que los genes pueden ser introducidos aumenta espectacularmente y también se eleva la eficacia de transferencia. En efecto, el vector que contiene la proteína VSV-G y la proteína HN exhibía una mayor eficacia de la transferencia génica que el vector que contenía VSV-G sola. En consecuencia, el vector que contiene la proteína VSV-G y la proteína HN es un vector preferido de la presente invención. Tales vectores pueden contener adicionalmente proteína F de paramixovirus. En resumen, tanto el vector que contiene proteína de envoltura anfotrópica retroviral, proteína F y proteína HN, como vector que contiene proteína VSV-G, proteína F y proteína HN están dentro del alcance de la presente invención. Además, estos vectores pueden contener adicionalmente proteína M de paramixovirus. En concreto, tanto el vector que contiene proteína de envoltura anfotrópica retroviral, proteína F, proteína HN, y proteína M como el vector que contiene proteína VSV-G, proteína F, proteína HN, y proteína M están dentro del alcance de la presente invención. El vector que contiene las proteínas F y HN paramixovirales, y el vector que contiene las proteínas F, HN y M, como se ha descrito anteriormente, también transferían genes con una alta eficacia a células que tienen moco, fracciones celulares que contienen células pluripotenciales hematopoyéticas, o similares, en las que los genes apenas eran transferidos mediante las técnicas convencionales.

Puesto que la proteína VSV-G es una glicoproteína y forma un homotrímero estable en la membrana, las partículas del vector son poco desorganizadas durante la purificación; de este modo las partículas pueden ser concentradas a un alto nivel mediante centrifugación (Yang, Y. et al, Hum Gene Ther.: Sep, 6 (9), 1203-1213. 1995). Los autores de la presente invención confirmaron que los vectores de SIV seudotipados con VSV-G y F y HN podrían ser concentrados mediante centrifugación.

No existe ninguna limitación sobre los tipos de proteínas HN, F, y M de paramixovirus que se van a utilizar para preparar vectores seudotipados. Particularmente, se prefieren las proteínas de Respirivirus incluyendo virus Sendai. Las proteínas HN, F, y M de virus Sendai incluyen, por ejemplo, las de la cepa Z. Las proteínas de la envoltura anfotrópica retroviral incluyen, por ejemplo, las proteínas de la envoltura de la cepa 4070A del virus de la leucemia de ratón (MuLV). También se puede utilizar las proteínas de la envoltura derivadas de 10A1 de MuMLV (por ejemplo, PCL-10A1 (Imgenex) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701 a 5705 (1996)). Las proteínas de la envoltura ecotrópica incluyen, por ejemplo, las proteínas de la envoltura del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV). La proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) incluye, por ejemplo, la proteína derivada de la cepa de serotipo Indiana (J. Virology 39: 519-528 (1981)). Además de éstas, las proteínas pueden derivar de las cepas deseadas.

Las proteínas de la envoltura antes mencionadas, incluyendo las proteínas HN, F, H, VSV-G, y de la envoltura retroviral, pueden ser proteínas intactas de virus de tipo salvaje o proteínas mutadas espontáneamente o artificialmente. Por ejemplo, la proteína HN, que es una proteína estructural, tiene tanto actividad hemaglutinina (que es de aglutinación de eritrocitos) como actividad de la neuraminidasa. Por ejemplo, la reducción de la primera actividad puede aumentar la estabilidad viral en la sangre. Por ejemplo, la eficacia de la infección a través de la proteína HN se puede controlar mediante la modificación de la última actividad. Alternativamente, la eficacia de fusión se puede controlar mediante la modificación de la proteína F que participa en la fusión de la membrana. Adicionalmente, por ejemplo, se analizan los epítopos presentadores de antígeno de la proteína F y la proteína HN que pueden servir como moléculas de antígeno de la superficie celular, y basándose en el resultado del análisis, se pueden preparar retrovirus seudotipo de la presente invención mediante el uso de las proteínas cuya capacidad presentadora de antígenos ha sido deteriorada. Además, es posible utilizar las proteínas de la envoltura de cepas atenuadas de paramixovirus patogénicos.

Por ejemplo, se pueden preparar vectores de transferencia génica de eficacia superior mediante seudotipado del vector retroviral de la presente invención utilizando proteínas modificadas que son las proteínas de la envoltura viral que tienen actividad hemaglutinina u otras proteínas de la envoltura cuyos dominios citoplásmico se han modificado por delección, sustitución y/o adición. La presente invención hace referencia a vectores retrovirales seudotipo que comprenden proteínas en las que una porción o la totalidad de un dominio citoplásmico de las proteínas de membrana de tipo salvaje que tienen actividad hemaglutinina han sido modificados mediante sustitución, delección, y/o adición. Específicamente, por ejemplo, la proteína HN y/o la proteína F modificadas de paramixovirus, en las que

se ha suprimido el dominio citoplásmico, o se ha sustituido por o añadido a la original un dominio citoplásmico de otra proteína de membrana (por ejemplo, la proteína de la envoltura de retrovirus, incluyendo lentivirus), se puede usar preferiblemente para producir un vector viral con alta infectividad. La presente invención proporciona una proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina en la que una porción o la totalidad de un dominio citoplásmico del tipo salvaje de la proteína de membrana ha sido modificadas por sustitución, delección, y/o adición, y el ácido nucleico que codifica la proteína (ADN, ARN, o similares). Particularmente, la presente invención proporciona una proteína hemaglutinina viral modificada cuyo dominio citoplásmico ha sido modificado por sustitución, delección, y/o adición, y el ácido nucleico que codifica la proteína. Por ejemplo, se prefiere una proteína HN modificado que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 40 o 41. Tales proteínas modificadas y los ácidos nucleicos que codifican las proteínas son útiles para producir virus seudotipo de la presente invención.

Específicamente, se pueden introducir genes foráneos con una alta eficacia en una amplia variedad de células incluyendo células humanas, mediante el uso de retrovirus seudotipados con una proteína HN de paramixovirus modificada cuyo dominio citoplásmico se ha reemplazado por el dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de lentivirus tal como SIV, o retrovirus (por ejemplo, la proteína codificada por pCAGGS-SIVct/HN de acuerdo con el Ejemplo 11); u otra proteína modificada en la que el dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de retrovirus tal como lentivirus ha sido añadida a la proteína HN de paramixovirus (por ejemplo, pCAGGS- SIVct + HN acuerdo con el Ejemplo 11). Se pueden suprimir porciones arbitrarias del dominio citoplásmico de la proteína HN; se puede añadir porciones arbitrarias del dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura retroviral; se pueden suprimir, sustituir, y/o añadir una porción o la totalidad del dominio citoplásmico.

Tal vector viral puede contener adicionalmente una proteína F modificada de paramixovirus. Por ejemplo, es posible usar una proteína F de paramixovirus cuyo dominio citoplásmico ha sido suprimido, o una proteína obtenida mediante la adición del dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de lentivirus tal como SIV, o retrovirus a tal proteína truncada. Específicamente, por ejemplo, se construye un plásmido para expresar una proteína F cuyos aminoácidos del dominio citoplásmico se suprimen. Se pueden suprimir porciones cualesquiera del dominio; se pueden suprimir una parte o la totalidad del dominio citoplásmico. El virus seudotipo que contiene una proteína F de virus Sendai truncada (Fct4) que tenía sólo cuatro aminoácidos del dominio citoplásmico mediante la supresión de los restantes mostró una eficacia de transferencia génica significativamente alto. De este modo, se puede preferir la proteína que no contiene ninguno o contiene sólo varios residuos de aminoácidos del dominio citoplásmico debido a una delección artificial para producir un virus seudotipo de la presente invención. Se puede producir una proteína en la que el dominio citoplásmico de la proteína F ha sido sustituido por un péptido distinto anclando una porción o la totalidad del dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de otro virus (por ejemplo, proteína de la envoltura lentiviral) a estas proteínas F truncadas. Por ejemplo, tales proteínas incluyen la proteína a la que se han anclado los primeros 11 aminoácidos del dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de SIV desde su extremo 5' (SIVct11). De este modo, la presente invención proporciona una proteína F de paramixovirus en la que una porción o la totalidad del dominio citoplásmico del tipo salvaje de la proteína han sido modificadas mediante sustitución, delección, y/o adición, y el ácido nucleico que codifica la proteína. En particular, la presente invención proporciona una proteína F cuyo dominio citoplásmico se ha sustituido por una porción o la totalidad de un dominio citoplásmico de la proteína de envoltura de un retrovirus, incluyendo lentivirus, y el ácido nucleico que codifica la proteína. Por ejemplo, se prefiere una proteína F modificada que comprende la secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, o 47. Estas proteínas modificadas y los ácidos nucleicos que codifican las proteínas pueden utilizarse para producir virus seudotipo de la presente invención.

También se prefiere utilizar la proteína HA de un virus perteneciente a Orthomyxoviridae como proteína de la envoltura viral que tiene actividad hemaglutinina. Por ejemplo, un virus seudotipo producido mediante el uso de un plásmido de expresión para la proteína de la envoltura del virus de influenza es infeccioso para una amplia variedad de células de mamífero incluyendo células humanas. La envoltura del virus de la influenza puede derivar de una cepa deseada de virus de la influenza aislado. En la gemación del virus de la influenza, la neuraminidasa es responsable de la escisión del enlace con el ácido siálico. De este modo, se pueden preparar partículas infecciosas de virus seudotipadas con HA mediante tratamiento con neuraminidasa. Alternativamente, el enlace con el ácido siálico se puede escindir de forma automática mediante el uso de un vector viral que también codifica una proteína que tiene actividad neuraminidasa. En tales casos, se prefiere particularmente utilizar una proteína de la envoltura viral que tenga actividad de neuraminidasa, tal como la proteína HN de paramixovirus. Por lo tanto, la presente invención proporciona vectores retrovirales seudotipados con proteína HA/HN.

El vector retroviral de la presente invención incluye también los derivados de oncovirus. El término "oncovirus" hace referencia a retrovirus que pertenecen a la subfamilia de oncovirus (Oncovirus). El oncovirus incluye retrovirus que participan en la canceración, tales como el virus de sarcoma, virus de leucemia, virus de tumor mamario, etc. Por ejemplo, el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) es uno de los primeros vectores retrovirales desarrollados, que tiene diversas mejoras y se utiliza ampliamente. Se puede utilizar preferiblemente en la presente invención un vector viral preparado mediante seudotipado de MoMLV con una proteína que tiene actividad hemaglutinina, tal como proteína HN de paramixovirus. Además, el virus de células pluripotenciales murinas (MSCV) utilizado en el Ejemplo es un vector de transferencia génica particularmente preferido en la transferencia de genes a hemocitos, células hematopoyéticas, células pluripotenciales embrionarias, etc.

- El vector retroviral de la presente invención también incluye los derivados de lentivirus. El término "lentivirus" hace referencia a un retrovirus que pertenece a la subfamilia de los lentivirus (lentivirus). El lentivirus incluye el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (por ejemplo, VIH-1 o VIH-2), el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el virus Maedi-Visna, el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV), etc. El vector retroviral de la presente invención puede derivar de una cepa o subtipo deseado. Por ejemplo, el VIH-1 incluye los del subtipo principal (M) (incluyendo A a J), N, y marginal (O) (del inglés "outlier") (Hu, D. J. et al, JAMA 1996; 275: 210-216; Zhu, T. et al, Nature 1998, 5; 391 (6667): 594-7; Simon, F. et al, Nat. Med. 1998, 4 (9): 1032-7). Las cepas de SIV aisladas incluyen, por ejemplo, SIVagm, SIVcpz, SIVmac, SIVmnd, SIVnm, SIVsyk, etc.
- Los lentivirus son infecciosos para células que no están en división y el genoma del virus se puede integrar en el cromosoma de la célula anfitriona. Se cree que las señales de translocación nuclear codificadas por gag y vpr son responsables de la integración. Cuando, utilizando esta característica, un vector viral de la presente invención se construye basándose en un lentivirus, se pueden introducir genes en células que no están en división en tejidos vivos y células que casi no se dividen, tales como células pluripotenciales en diferentes tejidos, lo que permite la expresión del gen a largo plazo.
- Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), antes de cualquier otro lentivirus, se utilizó para construir un vector, que también se puede utilizar preferiblemente en la presente invención. Los vectores se han desarrollado basándose en el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) (Poeschla, E. M. et al., Nature Medicine, 4 (3), 354-7, 1998) y virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) (MSELLI-LAKHAL, L. et al., Arch. Virol., 143 (4), 681-95, 1998). Estos vectores se pueden utilizar para producir vectores de la presente invención.
- Virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) fue descubierto como un virus similar al VIH derivado de monos, que junto con el VIH, forma el grupo de lentivirus de primates (E. Ido y M. Hayamizu, "Gene, Infection and Pathogenicity of Simian Immunodeficiency Virus", Protein, nucleic acid and enzyme, Vol. 39, Núm. 8, 1994). Este grupo se divide adicionalmente a grandes rasgos en cuatro subgrupos: (1) subgrupo de VIH-1 que contiene VIH-1 que es el virus causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y VIScpz aislado de chimpancé, (2) subgrupo de VIH-2 que contiene SIVsmm aislado de mangabey gris (*Cercocebus atys*), SIVmac aislado de mono rhesus (*Macaca mulatta*), y VIH-2 que es menos patógeno en seres humanos (Jaffar, S. et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 16 (5), 327-32, 1997); (3) subgrupo SIVagm representado por SIVagm aislado de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), y (4) subgrupo SIVmnd representado por SIVmnd aislado de Mandrill (*Papio esfinge*).
- No existe ningún informe que sugiera la patogenicidad de SIVagm y SIVmnd en anfitriones naturales (Ohta, Y. et al., Int. J. Cancer, 15, 41 (1), 115-22, 1988; Miura, T. et al, J. Med. Primatol., 18 (3-4), 255-9, 1989; M. Hayamizu, Nippon Rinsho, 47, 1, 1989). En particular, los informes anteriores describen que, de acuerdo con los resultados de los experimentos de infección, la cepa TYO-1, que es de SIVagm y también se utilizó en la presente memoria en los Ejemplos, no es patógena en mono cangrejero (*Macaca fascicularis*), mono rhesus (*Macaca mulatta*) así como en anfitriones naturales (Ali, M. et al, Gene Therapy, 1 (6), 367-84, 1994; Honjo, S et al, J. Med. Primatol., 19 (1), 9-20, 1990). No existe ningún informe sobre la infección por SIVagm a seres humanos y el inicio de la misma, y por lo tanto se cree que SIVagm puede no ser patógeno para los seres humanos. En general, los lentivirus de primate tiene especificidad de especie estricta, y existen pocos informes sobre casos de infección cruzada en especies con SIVagm de anfitriones naturales y la aparición de la misma y, si los hubiera, normalmente la frecuencia de aparición es baja y la enfermedad progresa lentamente (Novembre, F. J. et al., J. Virol., 71 (5), 4086-91, 1997). En consecuencia, se piensa que un vector viral preparado basándose en SIVagm, particularmente SIVagm TYO-1, es más seguro que los vectores basados en VIH-1 u otros lentivirus, y por lo tanto se puede utilizar preferiblemente en la presente invención.
- Además, el vector retroviral descrito en la presente memoria incluye los derivados de Spumavirus. El Spumavirus incluye, por ejemplo, virus espumoso (documentos DE4318387; WO9607749; Virology (1995) 210, 1, 167-178; J. Virol. (1996) 70, 1, 217-22). Los vectores de la presente invención derivados de virus espumosos se pueden utilizar para introducir genes foráneos en las células humanas, particularmente en la terapia génica y administración de vacunas recombinantes.
- En el vector retroviral descrito en la presente memoria, se puede modificar la LTR (repetición terminal larga). La LTR es una secuencia específica de retrovirus, que está presente en el genoma del virus en ambos extremos. La LTR 5' sirve como promotor, que intensifica la transcripción del ARNm a partir del provirus. De este modo, una sustitución de la porción que presenta la actividad promotora LTR 5' en el vector de transferencia génica por otro promotor que tenga una actividad promotora más fuerte puede conducir a un incremento de los niveles de transcripción del ARNm del vector de transferencia génica, lo que puede mejorar la eficacia de empaquetamiento y de este modo aumentar el título del vector. Además, por ejemplo, en el caso de los lentivirus, se sabe que la actividad de transcripción de LTR 5' es intensificada por la proteína tat viral, y por lo tanto la sustitución de un promotor independiente de la proteína tat por LTR 5' permite la exclusión de tat del vector empaquetamiento. El ARN intracelular del virus infectado a las células se transcribe de forma inversa y forma una estructura circular cerrada con un enlace entre las LTR de los dos extremos, y después se integra en el cromosoma de las células a través de la interacción entre el sitio de unión y la integrasa viral. El ARNm transcrito a partir del provirus corresponde a la región del sitio de

5 iniciación de la transcripción en la secuencia poliA LTR 5' a LTR 3' que se localiza aguas abajo; la porción promotora LTR 5' no es empaquetado en la partícula del virus. Por lo tanto, incluso si el promotor se sustituye por otra secuencia, la porción que es integrada en el cromosoma de las células diana no tiene ninguna alteración. Basándose en los hechos descritos anteriormente, una sustitución de promotor LTR 5' puede proporcionar un vector más seguro con un título más alto. Por lo tanto, una sustitución del promotor en el extremo 5' en un vector de transferencia génica puede aumentar el título de vectores empaquetables.

10 La seguridad se puede mejorar con un vector autodesactivador (vector SIN) que se prepara mediante eliminación parcial de la secuencia LTR 3' para evitar la transcripción del ARNm de vector completo en sus células diana. El provirus para lentivirus, que está integrado en el cromosoma de las células diana, tiene la porción U3 de la LTR 3' unida al extremo 5' de la misma. De este modo, en el cromosoma de las células diana, el vector de transferencia génica contiene U3 en el extremo 5' y por consiguiente comienza allí la transcripción del ARN que abarca el vector de transferencia génica completo. Si hubiera lentivirus o proteínas relacionadas en las células diana, el vector de transferencia génica se volvería a empaquetar e infectaría otras células. Además, existe la posibilidad de que un gen anfitrión situado adyacente al extremo 3' del genoma del virus pueda ser expresado por el promotor LTR 3' (Rosenberg, N., Jolicoeur, P., *Retroviral Pathogenesis*. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 475-585, 1997). Se reconoce que tales eventos son problemáticos con vectores retrovirales. Por lo tanto, el vector SIN se desarrolló como una solución para superar los problemas (Yu, S. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (10), 3194-8, 1986). Cuando la porción U3 se elimina de la LTR 3' en el vector de transferencia génica, no están presente en las células diana ni el promotor LTR 5' ni LTR 3'. En tales casos, no se transcriben ni el ARN viral completo ni el gen del anfitrión, si bien se logra la transcripción de los genes de interés con promotores internos; tal vector puede ser un vector de expresión en exceso con mayor seguridad, y por lo tanto es preferible en la presente invención. Los vectores SIN se pueden construir de acuerdo con cualquiera de los métodos conocidos en la técnica o el método descrito en el Ejemplo 5.

25 Se pueden producir retrovirus mediante la transcripción de un ADN vector de transferencia génica que contiene la señal de empaquetamiento en las células anfitrionas, y permitiendo la formación de partículas de virus en presencia de las proteínas de gag y pol, y proteínas de la envoltura. El ADN vector de transferencia génica puede ser un vector de ADN tal como un plásmido, o un ADN que ha sido integrado en el cromosoma de las células de empaquetamiento. Si bien es preferible integrar la secuencia señal de empaquetamiento codificada por el ADN vector de transferencia génica siempre que sea posible mantener la estructura formada basándose en la secuencia, es necesario reducir al mínimo la secuencia homóloga entre la señal de empaquetamiento en el ADN del vector y otro vector de empaquetamiento para proporcionar las proteínas gag y pol para reducir la frecuencia de formación de virus de tipo salvaje debida a la recombinación entre los tipos de vectores. Por consiguiente, es preferible construir el ADN vector de transferencia génica utilizando una secuencia tan corta como sea posible que comprenda la secuencia requerida para que el empaquetamiento satisfaga los criterios tanto de eficacia de empaquetamiento como de seguridad.

35 No existe ninguna limitación sobre el tipo de señal de empaquetamiento, con tal que se consiga en empaquetamiento en las células en las que se ha introducido el vector de empaquetamiento; se pueden utilizar aquellas derivadas de retrovirus, lentivirus, virus de la inmunodeficiencia, y similares dependiendo del tipo de vector de empaquetamiento .

40 Por ejemplo, en el caso del vector de empaquetamiento derivado de SIVagm usado en el Ejemplo, el tipo de virus del que se deriva la señal que se va a utilizar está limitado a SIV porque los vectores de VIH no están empaquetados. Sin embargo, el vector de transferencia génica derivado de SIV también es empaquetable cuando se utiliza un vector de empaquetamiento derivado de VIH. Por lo tanto, se puede reducir la frecuencia de formación de virus recombinante cuando las partículas del vector se forman mediante la combinación del vector de transferencia génica y el vector de empaquetamiento, derivados cada uno de tipos diferentes de lentivirus. En tales casos, se prefiere usar combinaciones de lentivirus en primates (por ejemplo, VIH y SIV).

50 En un ADN vector de transferencia génica preferido, la proteína gag ha sido modificada de manera que no sea expresada. La proteína gag viral se puede detectar como una sustancia foránea en el organismo vivo, y de ese modo como un antígeno potencial. Alternativamente, la proteína puede afectar a las funciones celulares. Para evitar la expresión de la proteína gag, se pueden introducir mutaciones de desplazamiento del marco para su modificación añadiendo o suprimiendo nucleótidos aguas abajo del codón de inicio de gag. También es preferible suprimir porciones de la región codificante de la proteína gag. En general, se sabe que una porción 5' de la región codificante de la proteína gag es esencial para el empaquetamiento del virus. Así, en un vector de transferencia génica, se prefiere que la región codificante para la proteína gag se suprima en el extremo C. Se prefiere suprimir la mayor porción de la región codificante de gag como sea posible, siempre que la delección no afecte considerablemente a la eficacia de empaquetamiento. Además, se prefiere reemplazar el codón de inicio (ATG) de la proteína gag por un codón distinto de ATG. Tal codón para el reemplazo se puede seleccionar apropiadamente para no que no afecte en gran medida a la eficacia de empaquetamiento. Se puede producir un vector viral que contiene el producto de transcripción del ADN vector de transferencia génica mediante la introducción del ADN vector de transferencia génica construido que comprende la señal de empaquetamiento en células de empaquetamiento apropiadas. Las partículas de vectores virales producidas se pueden recuperar a partir del sobrenadante de cultivo de las células de empaquetamiento, o similares.

No existe limitación sobre el tipo de célula de empaquetamiento, siempre y cuando la línea celular se utilice generalmente en la producción viral. Cuando se utiliza para el propósito de la terapia génica en seres humanos, es adecuada una célula humana o derivada de mono. Las líneas celulares humanas que se van a utilizar como células de empaquetamiento incluyen, por ejemplo, células 293, células 293T, células 293EBNA, células SW480, células U87MG, células HOS, células C8166, células MT-4, células Molt-4, células HeLa, células HT1080, células TE671, etc. Las líneas celulares de mono incluyen, por ejemplo, células COS1, células COS7, células CV-1, células BMT10, etc. Además, se pueden utilizar células de empaquetamiento establecidas previamente. Tales células de empaquetamiento incluyen, por ejemplo, células BOSC23, células PE501, etc.

No existe limitación sobre el tipo de gen foráneo que se van a insertar en el vector, que incluye, por ejemplo, ácidos nucleicos que no codifican ninguna proteína, tales como antisentido o ribozimas, así como ácidos nucleicos que codifican proteínas.

En los últimos años, se está prestando atención a una variedad de células pluripotenciales, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas como dianas de la terapia génica (Y. Hanazono, *Molecular Medicine*, vol. 36, Núm. 7, 1999). Como se muestra en el Ejemplo, el vector retroviral seudotipo de la presente invención puede transferir genes a células CD34 positivas derivadas de médula ósea humana con una alta eficacia; tal fracción que comprende las células CD34 positivas recibe atención como fracción celular que contiene células pluripotenciales hematopoyéticas en los últimos años. Los informes previos describen que las células CD34 positivas presentan pluripotencia en análisis de colonias utilizando un medio de cultivo que contiene metilcelulosa (Kirshenbaum, A. S. et al., *J. Immunol.*, 148 (3), 772-7, 1992) y que el trasplante de células CD34 positivas a ratones NOD/SCID que es una cepa inmunodeficiencia compuesta conduce a la localización de las células en la médula ósea de ratón y la reconstitución del sistema hematopoyético (Larochelle, A. et al., *Nat. Med.*, 2 (12), 1329-37, 1996). Por lo tanto, se piensa que las células inmaduras de tipo células pluripotenciales están presentes al menos en la fracción de células CD34 positivas. Las células pluripotenciales hematopoyéticas de la fracción de células CD34 positivas están en un estado de no división. En general, cuando se utiliza un vector retroviral, la eficacia de la transferencia génica en tales células es baja (Kiem, H. P. et al., *Curr. Opin. Oncol.*, 7 (2), 107-14, 1995.), pero la eficacia de la infección puede mejorar en gran medida mediante el uso del vector seudotipado de la presente invención. En particular, se espera que la eficacia de transferencia génica a células que no están en división aumente adicionalmente mediante el uso de un vector de lentivirus, tal como un vector VIH o SIV. Se describe un método para introducir genes en hemocitos o células hematopoyéticas, cuyo método comprende una etapa en la que se pone en contacto un vector retroviral seudotipo que contiene proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina con hemocitos o células hematopoyéticas, y el uso del vector retroviral seudotipo que contiene proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina para introducir genes en hemocitos o células hematopoyéticas. El vector retroviral de la presente invención, seudotipado mediante el uso de proteínas que tienen actividad hemaglutinina, puede transferir genes a hemocitos y células hematopoyéticas con una alta eficacia, y de este modo es útil en la terapia génica cuyo objetivo es las células de la sangre, p. ej., deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) (Blaese, R. M., *Pediatr. Res.*, 33 (1 Suppl), S49-53, 1993), hemofilia (Kay, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 96 (18), 9973-5, 1999) y anemia de Fanconi, etc. La administración se puede realizar, por ejemplo, mediante un método *ex vivo*.

La evaluación de la consecución de la introducción de genes foráneos en hemocitos y células hematopoyéticas se pueden realizar, por ejemplo, mediante análisis de citometría de flujo utilizando anticuerpos contra diferentes antígenos de superficie conocidos o análisis de colonias, o a través de la evaluación de la reconstitución del sistema hematopoyético basado en el trasplante de células hematopoyéticas en ratones cuyo sistema hematopoyético se ha desorganizado.

La terapia génica cuyas dianas son las células hematopoyéticas, a las cuales es aplicable el vector de la presente invención, incluye, por ejemplo, el uso del gen de resistencia a fármacos MDR1 para conservar las células pluripotenciales en la quimioterapia contra el cáncer (Licht, T. et al., *Gene Ther* (2000) 7, 4, 348-58); la introducción del gen FANCC normal para el tratamiento de la anemia de Fanconi (Liu, J. M. et al, *Hum. Gene Ther.* (1999) 10, 14 2337-46); la introducción de una combinación de citoquinas (trombopoyetina, interleuquinas 6 y 11, y ligando Flt-3) para potenciar la proliferación *ex vivo* de células pluripotenciales (documento WO 9907831); la expresión de proteínas quiméricas, tales como agonista Flt-3, para tratar la citopenia (documento WO 9846750); la introducción del gen de la  $\beta$ -globina humana para tratar la  $\beta$  talasemia (documento WO 9741141); una terapia combinada con antagonista de IL-6 y expresión de genes suicidas para el tratamiento del mieloma múltiple dependiente de IL-6 (patente de Alemania Núm. DE19704979); la introducción de genes tales como agonistas de receptores que comprenden una combinación de factores hematopoyéticos [interleuquinas (GM-CSF, G-CSF-Ser17, M-CSF, eritropoyetina, IL-1, IL-14, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13 e IL-15), factor inhibidor de leucemia (LIF), ligando flt3/flk2, somatotropina humana, factor de crecimiento de células B, factor de diferenciación de células B, factor de diferenciación de eritrocitos (EDF) o factor de células pluripotenciales (SCF)] (documento WO 9712985), agonista del receptor c-mpl que se va a utilizar para el cultivo de células pluripotenciales y la terapia génica para enfermedades hematopoyéticas (documento WO 9712978), IL-6 y proteína de fusión de IL-6 y receptor soluble de IL-6 que se va a utilizar para la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas humanas (*Nat. Biotechnol.* (1997) 15, 2, 142-45), superagonista y superantagonista de IL-6 que se van a utilizar para hacer proliferar células progenitoras hematopoyéticas (documento WO 9618648), factor X que se va a utilizar en la terapia para enfermedades de la sangre (*J. Cell. Bioche.* (1995) Suppl. 21A, 410), factor de células pluripotenciales, IL-6, y complejo receptor de IL-6 que se van a utilizar para hacer proliferar células progenitoras hematopoyéticas humanas

(Gene Ther. (1995) 2, 9, 694), ribozima cuyas dianas son virus de ARN, y ARN antisentido y/o señuelo que son útiles para prevenir la infección por VIH y para la inmunidad intracelular (documento WO 9622368).

El vector retroviral seudotipado con la proteína HN de la presente invención es altamente infeccioso para las células que contienen moco, tales como las células epiteliales de la mucosa de la cavidad nasal y las células epiteliales de la membrana de la mucosa bronquial en el pulmón. El vector de la presente invención es útil para la transferencia de alta eficacia de genes foráneos a células que contienen moco, en las que los genes son apenas transferidos mediante cualquiera de los métodos convencionales. Se describe un método para introducir genes en células que contienen moco, donde el método comprende una etapa en la que se pone en contacto un vector retroviral seudotipo que contiene proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina con células que contienen moco, y el uso del vector retroviral seudotipo que contiene proteínas de membrana que tiene actividad hemaglutinina para introducir genes en células que contienen moco. Tales células que contienen moco incluyen células epiteliales de la mucosa en particular, específicamente, por ejemplo, células epiteliales de la mucosa de la cavidad nasal o de los tubos bronquiales pulmonares.

Los ejemplos específicos para el uso incluyen, por ejemplo, la inducción de inmunoreacción a través de transferencia génica (IL-2, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , etc.) en la piel y la membrana mucosa donde las células presentadoras de antígeno (APC) son ventajosamente abundantes (documento WO 9505853); la vacunación contra rotavirus mediante la administración oral de genes a la membrana mucosa (J. Virol (1998.) 72, 7, 5757-61); la administración en la mucosa para tratar enfermedades autoinmunitarias (documento WO 9746253); administración en la mucosa para prevenir la infección (documento WO 9621356); la administración de genes a la membrana mucosa de los órganos genitales femeninos para prevenir el cáncer de cuello uterino causado por enfermedades de transmisión sexual o infección por virus del papiloma (Infect. Immun. (1998) 66, 1, 322-29); y la mejora de la simplicidad y seguridad de la administración mediante la administración a través de la membrana mucosa (Proc. Am. Assoc. Cancer Res. (1995) 36, 86 Meet., 418).

El vector retroviral seudotipo de la presente invención se puede preparar en forma de una composición combinándolo apropiadamente con un portador o medio farmacéuticamente aceptables. Específicamente, por ejemplo, el vector se puede formular en forma de una composición apropiadamente combinada con agua esterilizada, solución salina fisiológica, medio de cultivo, suero, solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS), etc. La composición puede contener adicionalmente otros componentes incluyendo estabilizadores, antimicrobianos, etc. La composición de la presente invención puede estar en una forma de dosificación tal como una disolución acuosa, cápsula, suspensión, jarabe, etc. Una composición que comprende el vector retroviral seudotipo de la presente invención es útil como reactivo o como fármaco. Por ejemplo, una composición de la presente invención se puede utilizar como reactivo para la transferencia génica *in vitro* o *in vivo* a células diferentes, o como un fármaco para la terapia génica *ex vivo* o *in vivo*. En general, la administración a los pacientes se puede lograr, por ejemplo, mediante un método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo la administración intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, entérica, oral, o intranasal, o la administración *ex vivo*. En particular, son adecuadas la administración a la membrana mucosa de la cavidad nasal o los tubos bronquiales y la administración *ex vivo* a hemocitos y células hematopoyéticas.

El vector viral de la presente invención se puede utilizar en la terapia génica otras para diversas enfermedades genéticas. No existe limitación sobre el tipo de enfermedad que se va a tratar. Por ejemplo, las enfermedades que se van a tratar y los genes causantes individuales de las mismas incluyen: enfermedad de Gaucher,  $\beta$ -cerebrosidasa (cromosoma 20); hemofilia, factor VIII de coagulación sanguínea (cromosoma X) y factor IX de coagulación sanguínea (cromosoma X); deficiencia de adenosina desaminasa, adenosina desaminasa; fenilcetonuria, fenilalanina hidroxilasa (cromosoma 12), distrofia muscular de Duchenne, distrofina (cromosoma X); hipercolesterolemia familiar, receptor de LDL (cromosoma 19), fibrosis quística, translocación cromosómica del gen CFTR. Las enfermedades diana en las que se piensa que están implicados otros múltiples genes incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, encefalopatía isquémica, demencia, e infección intratable tal como SIDA. Se puede considerar un tratamiento para inactivar el factor de transcripción del VIH, en donde un vector basado en SIV de esta invención se trabaja *in vitro* en una célula pluripotencial hematopoyética retirada de un paciente de SIDA extracelularmente, para aumentar la transcripción del genoma derivado de SIV antes de la infección por el VIH, y la célula transfectada se devuelve al cuerpo del paciente. Además, los ejemplos de posibles aplicaciones para las enfermedades crónicas incluyen: la supresión de la expresión de los genes VEGF y FGF2 para la enfermedad cardíaca isquémica, y la supresión de la expresión de los genes relacionados con la proliferación celular, tales como los factores de proliferación celular (PDGF, TGF- $\beta$ , etc.) y la quinasa dependiente de ciclina, para la terapia génica de la arteriosclerosis. Además, para la diabetes, el gen del BDNF puede ser un candidato. Además, este método se puede aplicar a la terapia de sustitución, en la que un gen tal como un gen supresor de cáncer, p53, cuya mutación genética causa canceración, es integrado en el cromosoma, y este método permite el tratamiento más allá de la limitación de la farmacoterapia del cáncer mediante la introducción de un gen resistente a múltiples fármacos en células pluripotenciales hematopoyéticas derivadas de médula ósea *in vitro* y, a continuación, mediante la devolución de estas células a la sangre del paciente. En cuanto a la terapia génica de enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide crónica, LEG, y glomerulonefritis, se hace posible la supresión de la expresión por medio de la expresión antisentido de receptores de células T, varios factores de adherencia (por ejemplo, ICAM-1, LFA-1, VCAM-1, y LFA-4 etc.), citoquinas y receptores de citoquinas (por ejemplo, TNF, IL-8, IL-6, e IL-1, etc.), factores de

proliferación celular (por ejemplo, PDGF, y TGF- $\beta$  etc.), y factores de activación (por ejemplo, MMP etc.). En cuanto a la terapia génica de las enfermedades alérgicas, se hace posible la supresión de la expresión por medio de la expresión antisentido de IL-4, Fc $\epsilon$ R-I, y similares. En cuanto a la terapia génica relacionada con el trasplante de órganos, se hace posible la elevación del porcentaje de éxito de un xenotrasplante al cambiar el antígeno de histocompatibilidad de un donante animal no humano a un tipo humano. Además, se puede considerar el tratamiento mediante la introducción de genes foráneos en el cromosoma de células ES humanas, compensando de este modo los genes deficientes en la fase embrionaria para complementar las deficiencias de las enzimas circulantes sistémicamente, los factores de crecimiento, y similares.

Por ejemplo, IL-4 promueve la diferenciación de linfocitos T coadyuvantes a linfocitos Th2. Los linfocitos Th2 secretan citoquinas, tales como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que median la inflamación asmática. La IL-4 es una molécula que induce la secreción de moco de procedente de la membrana mucosa pulmonar, que está implicada en los trastornos respiratorios. La IL-4 regula la expresión de VCAM-1 que es una molécula de adherencia celular que interactúa con la molécula VLA 4 presente en la superficie de eosinófilos. La interacción permite que los eosinófilos migren desde la sangre a los sitios de inflamación en los tejidos pulmonares. Puesto que IL-4 aumenta el número de células B e induce la producción de IgE específicas de antígenos responsables de las reacciones alérgicas. La IgE específica de antígeno producida induce la liberación de mediadores inflamatorios, tales como histamina, leucotrienos, desde los mastocitos, lo que da como resultado broncoconstricción. Basándose en dicho papel de IL-4, se puede utilizar vectores de expresión para el receptor de interleucina soluble 4 (IL-4), etc. para tratar a los pacientes de asma.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa patrones fotográficos que muestran los resultados obtenidos con células 293T infectadas con el virus de células pluripotenciales murinas (MSCV) seudotipado con proteínas F, HN, o F y HN de virus Sendai. El empaquetamiento del virus se logró mediante el uso de un vector de transferencia génica expresaba EGFP (pMSCV EGFP). Las marcas en los paneles anteriores, "F", "HN", y "F/HN", corresponden a los resultados obtenidos por la infección con los virus producidos mediante la expresión de las proteínas F, HN, y F y HN del virus Sendai en la célula de empaquetamiento, respectivamente. En la columna de "VSV-G/Nulo", el panel superior representa un control positivo seudotipado con VSV-G; los paneles medio e inferior representan controles negativos no seudotipados sin expresar proteínas env para el seudotipado, tales como F, HN, y VSV-G. Las marcas a la derecha de los paneles que indican "Eco" y "Anfo", corresponden a los resultados obtenidos utilizando virus preparados mediante la expresión de env ecotrópica y env anfotrópica en las células de empaquetamiento, respectivamente. La marca "Nulo" indica que la env de retrovirus no se expresó.

La Fig. 2 representa un patrón fotográfico que muestra los resultados del análisis de HA de los retrovirus que tienen env anfotrópica, que fueron seudotipado con HN del virus Sendai. También se indicaron las cantidades de pMSCV EGFP, pCI-Anfo, y pCAGGS-HN utilizadas en la producción viral (MSCV: anfo: HN en esta figura). Si bien que la no se detectó aglutinación de eritrocitos con el retrovirus de control que contenía env anfotrópica (Ampho-Retro en esta figura), se observó aglutinación con el retrovirus seudotipado con HN del virus Sendai (HN-Ampho-Retro en esta figura).

La Fig. 3 es un diagrama que muestra un resultado de análisis que comprende infectar con MSCV que contiene env anfotrópica seudotipado con la proteína HN del virus Sendai (HN-anfo en esta figura) células de la médula ósea humana y medir el porcentaje de células infectadas (células que expresan GFP) mediante fraccionamiento basado en citometría de flujo utilizando CD34 como marcador. El "anfo" indicado en esta figura hace referencia a un control que no está seudotipado con la proteína HN. Cada columna indica la proporción de células positivas para GFP frente a células negativas para CD34 (CD34-) o células positivas para CD34 (CD34 +).

La Fig. 4 representa una ilustración esquemática de las estructuras de: (a) el plásmido con el genoma de SIVagm, que se había utilizado como cadena principal para los otros constructos, (b) el vector de empaquetamiento construido, (c) el vector de transferencia génica, y (d) el vector de suministro VSV-G.

La Fig. 5 representa fotografías que muestran un resultado de la introducción mediada por vector de SIVagm del gen de  $\beta$ -galactosidasa en células 293T. El panel superior muestra un resultado obtenido mediante tinción con X-gal 48 horas después de la infección con el vector en células 293T utilizando el sobrenadante de las células transfectadas con el plásmido vector. La expresión de la  $\beta$ -galactosidasa se detecta en diversas células. El panel inferior muestra la tinción con X-gal de las células control no tratadas.

La Fig. 6 representa fotografías obtenidas mediante la introducción del gen de EGFP en células 293T detenidas en la fase G2-M y células SH-SY5Y diferenciadas mediante ácido retinoico, en las que la transferencia génica estuvo mediada por el vector SIN de SIVagm, y la observación de la expresión resultante utilizando un microscopio fluorescente. La expresión se confirmó bajo un microscopio de fluorescencia. El panel superior, 293T, magnificación  $x = 100$ , y el panel inferior, SH-SY5Y, aumento =  $x 200$ .

La Fig. 7 es una fotografía que muestra un resultado de una transferencia Western utilizando virosoma de FHN y virosoma de F dispuestos en aproximadamente el mismo diámetro de partícula.



- 5 La Fig. 8 representa fotografías que muestran un resultado obtenido mediante las observaciones de las células infectadas (células que expresan GFP). Se añadieron los SIV fusionados con virus Sendai (SeV) inactivado, virosoma de FHN, y virosoma de F (respectivamente, correspondiente a la fusión SIV-SeV, fusión SIV-virosoma de FHN, y fusión SIV-virosoma de F en esta figura) al sobrenadante de cultivo de células HeLa a una MOI = 10. Las mezclas se incubaron durante 10, 30, y 180 minutos para la infección, y a continuación se cambiaron los medios de cultivo por otros de nueva aportación. Las células se observaron 48 horas después de la infección. El SIV utilizado se había seudotipado con VSV-G. El SIV de esta Figura hace referencia a un control negativo que no se había fusionado con envoltura del virus Sendai.
- 10 La Fig. 9 representa fotografías que muestran un resultado obtenido sometiendo a electroforesis muestras de virosoma de FHN, virosoma de F, y virosoma de HN, seguido de tinción con plata. Calle 1, SeV (intacto); calle 2, SeV tratado con DTT; calle 3, SeV tratado con tripsina; calle 4, virosoma de FHN; calle 5, virosoma de F; calle 6, virosoma de HN.
- 15 La Fig. 10 representa un diagrama que muestra un resultado de análisis para la actividad de LacZ relativa. Se introdujeron en células 293T un vector de SIV de expresión de LacZ (seudotipado con VSV-G) y el mismo, pero fusionado adicionalmente con virosoma. El asterisco indica que había una diferencia significativa para SIV en la prueba t ( $p < 0,05$ ).
- 20 La Fig. 11 representa fotografías que muestran secciones congeladas de tráquea tres días después de la administración intranasal de 100  $\mu$ l de SIV-F/HN/M-EGFP  $10^8$  U.T. Las flechas en (b) indican células epiteliales de la tráquea, en las que se puede detectar fluorescencia de EGFP, mientras que solo se observan señales de fondo de bajo nivel en la muestra del ratón no tratado mostrado en (c). El panel (a) muestra un patrón de tinción con hematoxilina-eosina (H.E.) de una sección seriada.
- 25 La Fig. 12 representa fotografías (b) que muestran observaciones en la membrana mucosa septonasal de los mismos individuos que en la Fig. 11. La flecha indica el epitelio ciliado pseudoestratificado que exhibe fluorescencia de EGFP. (a) representa fotografías de secciones seriadas teñidas con H.E.
- 30 La Fig. 13 representa fotografías que muestran una comparación de las intensidades de fluorescencia de EGFP del vector retroviral seudotipo en las secciones de cavidad nasal de ratón. Se muestran las imágenes de fluorescencia de EGFP de SIV seudotipado con VSV-G (SIV-VSV-EGFP), MSCV que contiene env anfitriónica seudotipado con F, HN, y M (MSCV-F/HN/M-EGFP), y SIV con VSV-G seudotipado con F, HN, y M (SIV-F/HN/M-EGFP). Se detectan señales relativamente más fuertes en MSCV-F/HN/M-EGFP y SIV-F/HN/M-EGFP que contiene las proteínas F, HN, y M; particularmente, la señal es más alta en SIV-F/HN/M-EGFP.
- 35 La Fig. 14 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) en el límite entre el dominio citoplásmico de SIV y el dominio transmembrana de la proteína HN (fuente estándar) en la proteína codificada por el plásmido de expresión de HN con una sustitución del dominio citoplásmico.
- La Fig. 15 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 41) en el límite entre el dominio citoplásmico (subrayado) y el dominio transmembrana de la proteína HN (fuente estándar) en la proteína codificada por el plásmido de expresión de HN con la adición del dominio citoplásmico de SIV.
- 40 La Fig. 16 muestra las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 42 a 44) en el límite entre el dominio transmembrana de la proteína F (cursiva) y el dominio citoplásmico de la proteína F (fuente estándar) en las proteínas codificadas por los plásmidos de expresión de F con una delección en el dominio citoplásmico.
- 45 La Fig. 17 muestra las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 45 a 47) en los límites entre el dominio transmembrana de la proteína F (cursiva sin subrayado), el dominio citoplásmico de la proteína F (fuente estándar), y los 11 aminoácidos del dominio citoplásmico de SIV (SIV<sub>c11</sub>) (subrayado) en las proteínas codificadas por los plásmidos de expresión de F en los que el dominio citoplásmico de F ha sido remplazado por el dominio citoplásmico de SIV.
- La Fig. 18 representa fotografías que muestran la transferencia génica en células 293T por medio del vector de SIV seudotipado con F/HN de SeV.
- La Fig. 19 representa fotografías que muestran la transferencia génica en las células BEAS-2B por medio del vector de SIV seudotipado con F/HN de SeV.
- 50 La Fig. 20 representa fotografías que muestran la transferencia génica en células 293T por medio del vector de SIV seudotipado con F/HN de SeV con una adición de SIV<sub>c11</sub>.
- La Fig. 21 representa fotografías que muestran el vector de SIV seudotipado con F/HN de SeV enriquecido.
- La Fig. 22 representa fotografías que muestran la transferencia génica por medio del vector retroviral seudotipo F/HN SeV basado en MSCV.

La Fig. 23 representa fotografías que muestran la transferencia génica por medio del vector viral seudotipado con la envoltura del virus de la influenza.

La Fig. 24 representa fotografías que muestran el vector viral enriquecido seudotipado con la envoltura del virus de la influenza.

- 5 La Fig. 25 representa fotografías que muestran la transferencia génica por medio de vectores virales seudotipados con la envoltura del virus de la influenza y diversas proteínas HN.

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá específicamente a continuación utilizando Ejemplos, sin embargo, no debe interpretarse que está limitada por los mismos.

- 10 [Ejemplo 1] Preparación de vectores retrovirales seudotipados con la proteína de la envoltura del virus Sendai

Se obtuvieron los genes para las proteínas F, HN, y M dirigiendo el ADN del genoma completo de la cepa Z del virus Sendai pSeV18<sup>b</sup> (+) (Hasan, M. K. et al, 1997, J. General Virology 78: 2813-2820), y se insertaron en pCAGGS (Niwa, H. et al, Gene: 108, 193-9, 1991) en el sitio *Xho*I, para preparar vectores de expresión para las proteínas F, HN, y M del virus Sendai (referidos como pCAGGS F, pCAGGS HN, y pCAGGS M, respectivamente).

- 15 La línea celular derivada de riñón fetal humano, células 293T (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, págs. 8392-8396, 1993), que se utilizó para producir retrovirus, se cultivó en D-MEM (Gibco BRL) que contenía suero bovino fetal inactivado al 10%. El cultivo se llevó a cabo en placas de plástico (Sumitomo Bakelite). La transfección del vector se llevó a cabo utilizando LIPOFECTAMINE PLUS (Gibco BRL) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas. Las células 293T se cultivaron en placas de plástico de 6 pocillos (Sumitomo Bakelite) a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/pocillo, y se incubaron en una incubadora CO<sub>2</sub> con 10% de gas CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas. Treinta minutos antes de la transfección, el medio de cultivo se cambió por 800 µl/pocillo de D-MEM (Gibco BRL) que contenía albúmina de suero bovino al 1% (Gibco BRL), y después se continuó el cultivo.

- 25 El vector de transferencia génica utilizado fue un vector basado en virus de células pluripotenciales murinas (MSCV) (Clontech) (RG Hawley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 10297-10302 (1996); RG Hawley et al, Gene Therapy 1: 136-138 (1994)) que contenía el gen de EGFP como gen informador. Las cantidades de los ADN utilizados en la transfección son las siguientes: 700 ng/pocillo de vector de transferencia génica y 300 ng/pocillo de vector de empaquetamiento (PCL-Eco, PCL-Anfo (MuMLV 4070A) (ambos fueron adquiridos de IMGENEX) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol 70: 5701-5705 (1996)): estos se utilizaron combinados con 200 ng/pocillo del vector de expresión para la proteína de la envoltura del virus Sendai (pCAGGS F y pCAGGS HN) y 200 ng/pocillo del vector de expresión para la proteína M del virus Sendai (pCAGGS M) (Tabla 2). El ADN se disolvió en 100 µl de OptiMEM y después se añadieron a esto 6 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se diluyeron 4 µl de LIPOFECTAMINE con 100 µl de OptiMEM, y después se añadieron a la mezcla de ADN y reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla resultante se agitó y se dejó estar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución que contenía el complejo de ADN y LIPOFECTAMINE preparado mediante el procedimiento anterior se añadió gota a gota a las células 293T incubadas en una placa de 6 pocillos. Después de ser agitada suavemente, la mezcla se incubó en una incubadora de CO<sub>2</sub> con gas CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Después del cultivo, se añadió al cultivo 1 ml/pocillo de D-MEM (Gibco BRL) que contenía albúmina de suero bovino al 1% (Gibco BRL) y 15 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). La mezcla se incubó en una incubadora de CO<sub>2</sub> con gas CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 24 horas. A continuación, el sobrenadante del cultivo se filtró con un filtro con poros de 0,45 µm de diámetro (filtro DISMIC-25CS; ADVANTEC). La solución resultante se utilizó como disolución de vector.

[Ejemplo 2] Efecto de la proteína de la envoltura del virus Sendai sobre el seudotipado de vectores de retrovirus

El vector retroviral seudotipado con la proteína de la envoltura del virus Sendai se preparó mediante el método anteriormente mencionado y se evaluó su efecto.

- 45 Las células 293T utilizadas como diana se cultivaron en una placa de plástico de 6 pocillos (Sumitomo Bakelite) a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/pocillo, y después se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> con gas CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. La introducción del vector viral en las células diana se logró superponiendo la disolución que se había preparado mediante la adición de suero bovino fetal inactivado y polibreno (Sigma) a concentraciones finales de 10% y 8 µg/ml, respectivamente, a una disolución que contenía el vector viral. A las 48 horas de la introducción del vector, las células diana se fijaron utilizando PBS (Invitrogen) que contenía formaldehído 2% y glutaraldehído al 0,2% a temperatura ambiente durante 20 minutos, y después se lavaron una vez con PBS (Invitrogen). A continuación, las células se observaron bajo un microscopio de fluorescencia invertido (DMIRB (SLR), Leica) para detectar la expresión de EGFP en las células diana.

- 55 En primer lugar, se introdujeron simultáneamente uno o ambos del plásmido expresión de la proteína F (pCAGGS F) y plásmido de expresión de la proteína HN (pCAGGS HN), que son proteínas de la envoltura del virus Sendai, con un vector de transferencia génica basado en retrovirus (pMSCV EGFP) en células 293T en ausencia de vector de

empaquetamiento. El sobrenadante del cultivo se recogió y se sometió a ensayo para determinar la introducción del gen de EGFP o la proteína EGFP en las células 293T como células diana. Los resultados obtenidos infectando células 293T con los vectores preparados mediante el uso de diversas combinaciones de los 12 tipos partiendo de "((1))" en la mitad inferior de la Tabla 2 se muestran en la Fig. 1. Como se muestra en el panel "Nulo" en la Fig. 1, en ausencia de vector de empaquetamiento, no se transfirieron ni el gen ni la, ni siquiera cuando la proteína F y la proteína HN se expresaron en células humanas. De ese modo, se encontró que la expresión de la proteína F y la proteína HN solas era insuficiente para producir vectores retrovirales capaces de transferir genes y para introducir la proteína EGFP en las células diana.

Cuando el empaquetamiento se lleva a cabo utilizando la proteína de envoltura ecotrópica que es una proteína de la envoltura que no tiene infectividad para células humanas, no se logró la transferencia génica a células humanas con el vector seudotipado con la proteína F o la proteína HN solas, como se muestra en el panel "Eco" en la Fig. 1. Por otra parte, el vector seudotipado co-expresando la proteína F y la proteína HN transfirió el gen a células humanas para las cuales el virus original no es infeccioso. El resultado indica que los vectores derivados de virus distintos del virus Sendai pueden ser seudotipados con la proteína F y proteína HN del virus Sendai, y de este modo se pueden ampliar las gamas de anfitrión para la infección de vectores distintos del virus Sendai.

Cuando empaquetamiento se llevó a cabo utilizando la proteína de la envoltura anfotrópica que tenía infectividad para las células humanas, la eficacia de la transferencia génica mejoró por el seudotipado del vector mediante la expresión de la proteína HN sola, o por la expresión simultánea de la proteína F y la proteína HN, como se observa en el panel "Anfo" en la Fig. 1. El resultado indica que los vectores derivados de virus distintos del virus Sendai puede ser seudotipados con la proteína HN del virus Sendai sola, y la eficacia de la transferencia génica mediada por un vector derivado de un virus distinto del virus Sendai puede mejorar mediante el seudotipado del vector con la proteína HN del Sendai virus de sola, o con la proteína F y la proteína HN del virus Sendai.

Además, puesto que el virus Sendai tiene típicamente alta infectividad para las células que contienen moco, tales como las células epiteliales de la membrana de la mucosa bronquial en el pulmón, se puede utilizar otros vectores seudotipados con la proteína HN sola, o la proteína F y la proteína HN para la transferencia génica a las células que contienen moco.

[Ejemplo 3] Producción de vector retroviral seudotipo HN-Anfo y comparación de la eficacia de la transferencia génica a células humanas de médula ósea, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas entre el vector viral seudotipo y el vector retroviral anfotrópico

#### 1. Cultivo de células 293T

Las células 293T se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía FCS al 10% y 800 mg/ml de G418 de acuerdo con el método convencional. Utilizando una placa de 10 cm, las células se diluyeron a  $8 \times 10^6$  células/placa el día antes de la transfección, y después se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10%.

#### 2. Transfección

Se combinaron entre sí 5,6 µg de pMSCV EGFP, 2,4 g de PCL-Anfo (IMGENEX), y 1,6 µg de pCAGGS-HN, y se añadieron a esto 800 µl de OPTIMEM. Se añadieron adicionalmente a la mezcla 48 µl de la disolución Plus en un kit Lipofectamine Plus (GIBCO BRL), y la mezcla resultante se dejó reposar durante 15 minutos. En un tubo separado, se combinaron entre sí 800 µl de OPTIMEM y 32 µl de disolución de Lipofectamina. La mezcla de ADN y la mezcla de Lipofectamina se mezclaron y se dejaron reposar durante 15 minutos. El medio de cultivo se retiró y la mezcla de transfección se añadió gota a gota sobre las células 293T en 500 µl de DMEM que contenía BSA al 1%. Las células se incubaron en gas CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Se llevó a cabo un experimento de transfección de control utilizando 5,6 µg de pMSCV EGFP y 4,0 µg de PCL-Anfo. Tres horas después de la transfección, el medio de cultivo se reemplazó por 10 ml de DMEM modificado de Iscove (IMDM) que contenía FCS al 10%. Al día siguiente, el medio se cambió de nuevo por IMDM que contenía FCS al 10%, y el cultivo se continuó adicionalmente durante 24 horas.

#### 3. Recoleccion de disolución de virus

El sobrenadante del cultivo celular se recogió 48 horas después de la transfección. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0,45 µm y después se almacenó a -80°C.

#### 4. Análisis para determinar la actividad hemaglutinina

Los retrovirus que tenían env anfotrópica seudotipados con HN se prepararon a diferentes proporciones de pMSCV EGFP, pCl-Anfo, y pCAGGS-HN de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Se sometió a ensayo la actividad hemaglutinina viral (actividad de aglutinación de eritrocitos; actividad HA). También se sometió a ensayo como control la actividad hemaglutinina de retrovirus que tenían env anfotrópica. El análisis para determinar la actividad de HA se llevó a cabo de acuerdo con el método convencional. El resultado demostró que el retrovirus seudotipado con HN y env anfotrópica tenía actividad HA y las partículas de virus contenían proteínas que mostraban actividad hemaglutinina (Fig. 2).

5. Transferencia génica a células CD34<sup>+</sup> de médula ósea humana

Las células CD34<sup>+</sup> de médula ósea humana se adquirieron de BIO WHITTAKER. Después de la descongelación, junto con  $1 \times 10^5$ /ml del virus recombinante recogido en la Sección 3, las células se cultivaron en IMDM que contenía 50 ng/ml de IL-6, 100 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de Factor de Células Pluripotenciales (GIBCO BRL), 100 ng/ml de ligando Flt-3 (Reseach Diagnostics, Flanders, NJ) (todas las anteriores eran proteínas recombinantes humanas), y FCS al 10% en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante la noche. A las 48, 51, 72, y 75 horas del inicio del cultivo, se cambió el medio por una disolución de virus descongelada de nueva aportación, y se añadieron a las células 50 ng/ml de IL-6, 100 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de Factor de Células Pluripotenciales, y 100 ng/ml de ligando Flt-3. A las 120 horas del inicio del cultivo, las células se recogieron.

## 10 6. Análisis mediante citometría de flujo

Las células recogidas se tiñeron con anticuerpo anti-CD34 humano marcado con PE (Becton Dickinson), y después se analizaron mediante citometría de flujo (EPICS ELITE, Coulter) utilizando dos sondas de fluorescencia de GFP y PE. De acuerdo con el resultado, las proporciones de las células positivas para GFP en las células negativas para CD34 (CD34-) y las células positivas para CD34 (CD34+) infectadas con el vector retroviral anfotrópico (anfo) que contenían la envoltura de tipo salvaje fueron solo de 0,3% y 3,6%, respectivamente. Sin embargo, las proporciones de células positivas para GFP en las células negativas para CD34 (CD34-) y las células positivas para CD34 (CD34+) infectadas con vector de retrovirus HN-anfotrópico (HN-anfo) que contenían la envoltura seudotipo fueron de 33% y 25%, respectivamente, y por lo tanto se encontró que el seudotipado con la proteína HN aumentaba significativamente la eficacia de la transferencia génica en células de médula ósea humana, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas (Fig. 3).

## [Ejemplo 4] Método para la preparación de vectores de virus seudotipo

Se prepararon vectores retrovirales seudotipados con diferentes proteínas de la envoltura utilizando el pMSCV EGFP descrito anteriormente o pLZRNL que expresaba lacZ bajo el control del LTR derivado del virus del sarcoma murino de Moloney (Yee, J. K. et al., *Methods in Cell Biology*, vol. 43, págs. 99-112 (1994); Xu, L. et al, *Virology* 171, 331-341 (1989)) como vector de transferencia génica..

Se cultivaron células 293T (línea celular de riñón fetal humano) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)-alto contenido de glucosa (Gibco BRL) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C. Las células 293T se cultivaron en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/pocillo, y después se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 800 µl/pocillo de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. Las células se utilizaron después en la transfección. En las combinaciones indicadas en la Tabla 2 siguiente, 700 ng de vector de transferencia génica (pMSCV EGFP o pLZRNL), 100 ng de plásmido de expresión de VSV-G pVSV-G (derivado de la cepa de serotipo Indiana) (Clontech), 200 ng de cada uno de los plásmidos de expresión de las proteínas HN, F, y M del Sendai virus, pCAGGS-HN, pCAGGS-F, y pCAGGS-M, y 300 ng de cada uno de los plásmidos de expresión de la proteína de la cubierta de retrovirus de ratón, PCL-Eco y PCL-Anfo (IMGENEX) (Naviaux, R.K. et al, *J. Virol* 70: 5701-5705 (1996)), se disolvieron en 100 µl de Opti MEM en cada pocillo. A continuación, se añadieron al pocillo 6 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla disolución obtenida mediante dilución de 4 µl de Reactivo LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 100 µl de Opti MEM. La disolución mezclada se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293T preparadas anteriormente mientras se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió a cada pocillo 1 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 15 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Las células se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas y, a continuación el sobrenadante de cultivo se recogió, y se filtró con un filtro con poros de 0,45 µm de diámetro; la solución resultante se utilizó como una disolución de vector.

Tabla 2

	env		Vector de transferencia génica	
	Retro	SeV/VSV	in vitro	in vivo
①	-	F/M	pMSCV-EGFP o pLZRNL	pMSCV-EGFP  (9) :Fig. 13)
②		HN/M		
③		F/HN/M		
④	Eco	F/M		
⑤		HN/M		
⑥		F/HN/M		
⑦	Anfo	F/M		
⑧		HN/M		
⑨		F/HN/M		
⑩	Eco	-		
⑪	Anfo	-		
⑫	Eco	VSV-G		
①	-	F	pMSCV-EGFP o pLZRNL (Fig.1)	ND
②		HN		
③		F/HN		
④	Eco	F		
⑤		HN		
⑥		F/HN		
⑦	Anfo	F		
⑧		HN		
⑨		F/HN		
⑩	Eco	-		
⑪	Anfo	-		
⑫	Eco	VSV-G		

(Las indicados de la columna "Env" en esta Tabla, son proteínas de la envoltura derivadas de retrovirus (retro), virus Sendai (SEV), y virus de la estomatitis vesicular (VSV) que se utilizan en la producción de virus. Los vectores de transferencia génica utilizados fueron pMSCV EGFP o pLZRNL, que se utilizaron en la transferencia génica *in vitro* e *in vivo*, como se muestra en esta Tabla. El vector indicado en la parte superior (9) en la Tabla, que se había preparado utilizando pMSCV EGFP como vector de transferencia génica, se utilizó en el experimento en la Fig. 13. Los 12 tipos de vectores indicados en la parte inferior (1) a (12), que se había preparado utilizando pLZRNL, se utilizaron en el experimento en la Fig. 1).

[Ejemplo 5] Construcción de vectores de lentivirus pseudotipo VSV-G

Se utilizó un clon no patógeno del virus de la inmunodeficiencia de mono verde africano, cepa SIVagm TYO-1, para construir los vectores. En lo sucesivo, los nucleótidos se numeran tomando el sitio de iniciación de la transcripción del ARN viral como +1. El plásmido con SIVagm TYO-1 insertado utilizado fue pSA212 (J. Viol., Vol. 64, págs. 307-312, 1990). Cada reacción de ligación se llevó a cabo utilizando Ligation High (Toyobo) de acuerdo con las instrucciones adjuntas. Todos los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron sintetizados y purificados con cartuchos de fase inversa o mediante HPLC de fase inversa en la División de Investigación Bioquímica de la Nippon Flour Mills Co., Ltd. a través del Departamento de Síntesis de ADN Personalizado, Greiner Japón. Las secuencias de los oligonucleótidos sintéticos son las siguientes:

1F (VTRF-BglII) :

5' -GCAGATCTCAACCAGGAGGCGAGGCTGCATTTTGGG-3' (SEQ ID NO: 1)

1R (VTRR-EcoRI) :

5' -GCGAATTCTACTTACTGGTGCTGTAAAGGAGCCAAA-3' (SEQ ID NO: 2)

ES 2 430 991 T3

2F (RRE6964E) :

5'-ATCGGAATTCTTTTATTGTAAGATGGATTGGTTTTTAAAT-3' (SEQ ID NO: 3)

2R (RRE-SA+BN) :

5'-CGGGATCCGCGGCCGCGGATATGGATCTGTGGAGATAGAGGAACATAT-3' (SEQ ID NO: 4)

3F (SDFXhoSpe) :

5'-TCGAGACTAGTGACTTGGTGAGTAGGCTT-3' (SEQ ID NO: 5)

3R (SDR-Sal) :

5'-TCGAAAGCCTACTCACCAAGTCACTACTC-3' (SEQ ID NO: 6)

5

4F: 5'-AATTTCTCGAGCGGCCGCA-3' (SEQ ID NO: 7)

4R: 5'-AATTTGCGGCCGCTCGAGA-3' (SEQ ID NO: 8)

5-1F (5LTRU3FKpn) :

5'-GCGGTACCTGGATGGGATTTACTCCGATAGGA-3' (SEQ ID NO: 9)

5-1R (GAGR-2Eco) :

5'-GCGAATTCGATAGGGCTTGAAACATGGGTACTATTTCTGC-3' (SEQ ID NO: 10)

5-2F (RREF-EcoRI) :

5'-GCGAATTCCTCGTTTGTGCTAGGGTTCTTAGGCTTCT-3' (SEQ ID NO: 11)

5-2R (RRESA+Rsac) :

10

5'-TCCCCGCGGATATGGATCTGTGGAGATAGAGGAACATATC-3' (SEQ ID NO: 12)

5-3F (3LTRF BS) :

5'-GCGCGGCCGCGGATCCGTCGACGCACTTTTTAAAGAAAAGGGA-3' (SEQ ID NO: 13)

5-3R (3LTRR-SacI) :

5'-GCGAGCTCTAATGCAGGCAAGTTTATTAGCTTTCTA-3' (SEQ ID NO: 14)

6F (CMVFEcoSac) :

5'-GGAATTCCTCGCGGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG-3' (SEQ ID NO: 15)

6R (EGFPRstoNB) :

5'-CGGGATCCGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3' (SEQ ID NO: 16)

9-1F (LTRF1 CMVU3F) :

15

5'-TATATAAGCAGAGCTCGCTGGCTTGTAACCTCAGTCTCTTA-3' (SEQ ID NO: 17)

9-2F (LTRF2 EF1aU3F) :

5'-TATATAAGTGCAGTACGCTGGCTTGTAACCTCAGTCTCTTA-3' (SEQ ID NO: 18)

9-3F (CAGU3F) :

5'-TATAAAAAGCGAAGCCGCTGGCTTGTAACCTCAGTCTCTTA-3' (SEQ ID NO: 19)

9R (GAGR-2Eco) :

5'-GCGAATTCGATAGGGCTTGAAACATGGGTACTATTTCTGC-3' (SEQ ID NO: 20)

10-1F:

5'-CGGGGTACCTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATT-3' (SEQ ID NO: 21)

10-1R(U3CMVR):

5'-AGTTACAAGCCAGCGAGCTCTGCTTATATAGACCTCCCAC-3' (SEQ ID NO: 22)

11F(LTRF LdU3FSa1SC):

5'-ATGCGAGCTCGTCGACGCACTTTTTAAAAGAAAAGGGAGGACTGGATGGGATTTATTACTC  
CGATAGGACGCTGGCTTGTAAGTCTCTTACTAGG-3' (SEQ ID NO: 23)

11R(3LTRR-SacI):

5'-GCGAGCTCTAATGCAGGCAAGTTTATTAGCTTTCTA-3' (SEQ ID NO: 24)

5 <Preparación de fragmentos de ADN mediante PCR>

Todos los experimentos de PCR se llevaron a cabo utilizando una PCR Supermix High Fidelity (Gibco BRL). Se añadió un par de oligonucleótidos sintéticos como cebadores a una concentración final de 1 nmol/ml a 90 µl de disolución de reacción que contenía 1 mg de ADN molde y, a continuación se ajustó el volumen total a 100 µl con agua destilada. La reacción se llevó a cabo en un GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer). El perfil de PCR utilizado fue el siguiente: pre-incubación a 94°C durante 1 minuto, 10 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, recocido a 55°C durante 30 segundos, y prolongación a 68°C durante 90 segundos, seguido de incubación a 68°C durante 5 minutos. Después de la reacción, las muestras se purificaron utilizando Wizard DNA Clean-up System (Promega), ambos extremos de los productos de PCR se trataron con las enzimas de restricción apropiadas, y se fraccionaron en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión al 1% (agarosa SeaPlaque GTG, FMC Biochem; disuelta en tampón TAE). Los fragmentos de ADN de interés se escindieron del gel y se purificaron con Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). Los ADN purificados se utilizaron en la reacción de ligación.

<Construcción de vectores>

20 Se construyeron los plásmidos que proporcionaban las estructuras de las cadenas principales para los vectores (Fig. 4). Es decir, estos plásmidos fueron los "vectores de empaquetamiento" que proporcionaban las proteínas esenciales para la formación de las partículas de vector en *trans*, el "vector de transferencia génica" que proporcionaba el ARNm que se iba a empaquetar en el vector y que liberaba e introducía los genes de interés en las células diana, y el vector que proporcionaba las proteínas de la cubierta que participaban en la formación de las partículas del vector seudotipo.

25 Se construyeron los plásmidos de expresión en cada uno de los cuales estaba localizada una secuencia para gag, pol, tat, rev, vif, vpr o/x aguas abajo del promotor para proporcionar las proteínas necesarias para la formación de las partículas de vector. La mayoría de las partes de la señal de empaquetamiento Ψ y env se eliminaron para evitar la generación de partículas de virus de tipo salvaje. Se insertó una secuencia SD aguas arriba de gag y se insertó una secuencia RRE aguas abajo del primer exón de tat/rev para permitir la expresión de todos los genes en el vector de empaquetamiento. Además, se excluyó la secuencia nef completa porque se pronosticó que no era esencial para el empaquetamiento del vector (Fig. 4b).

35 Las secuencias LTR de los dos extremos del genoma, SD, Ψ, y RRE se insertaron en el vector de transferencia génica que proporcionaba el ARN que se iba a empaquetar en el vector. Adicionalmente, se sustituyó un promotor foráneo por la región de promotor LTR 5' en el vector de transferencia génica. Además, se preparó un vector de autodesactivación (vector SIN), en el que una porción de la secuencia LTR 3' se había retirado para evitar la transcripción del ARNm del vector completo en las células diana; este vector contiene como insertos el gen de la β-galactosidasa como gen informador y el promotor de CMV para la expresión del gen informador (Fig. 4c).

El vector utilizado para proporcionar VSV-G fue pVSV-G de probada eficacia en el seudotipado de vectores retrovirales y de VIH (Fig. 4d) (Burns, J. C. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-8037).

40 Más abajo se proporciona una descripción más específica.

<Construcción de vectores de empaquetamiento>

45 Se preparó un fragmento de ADN correspondiente a la región (5337 a 5770) que contenía vif y el primer exón de tat/rev mediante PCR utilizando un par de cebadores 1F y 1R y pSA212 como molde. Se había añadido un sitio para la enzima de restricción EcoRI a uno de los cebadores de PCR, y de este modo el fragmento de ADN preparado contenía un sitio EcoRI en su extremo 3'. El fragmento de PCR se digirió con BglII y EcoRI, y se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). El fragmento de ADN

preparado como se ha descrito anteriormente y otro fragmento de ADN que codificaba la región gag/pol (desde el sitio XhoI (356) al sitio BglII (5338)) se ligaron en pBluescript KS+ (Stratagene) entre los sitios XhoI y EcoRI. A continuación, se amplificaron un elemento sensible a Rev (RRE) y un fragmento de ADN correspondiente a la región que contenía el segundo exón (6964-7993) de tat/rev mediante PCR. Se añadió un sitio NotI al extremo 3' mediante PCR utilizando el par de cebadores 2F y 2R y utilizando pSA212 como molde mediante el mismo procedimiento utilizado para preparar el fragmento de PCR descrito anteriormente. El fragmento de PCR resultante se digirió doblemente con EcoRI y NotI, seguido por la purificación. El fragmento se insertó en pBluescript KS+ que contenía gag-tat/rev entre los sitios EcoRI y NotI.

Se insertó un fragmento de ADN (3F y 3R) que comprendía una secuencia para el sitio donador de empalme (SD), que se había sintetizado para que tuviera un sitio XhoI y un sitio Sall en los extremos 5' y 3', respectivamente, en el sitio XhoI de pBluescript KS+ descrito anteriormente que contenía gag-RRE-tat/rev. El plásmido resultante se digirió con XhoI y NotI. Se purificó el fragmento que contenía SD-gag-RRE-tat/rev. Se preparó un plásmido insertando un conector XhoI/NotI (4F y 4R) en pCAGGS (Gene, vol. 108, págs. 193-200, 1991) en el sitio EcoRI, y después se insertó el fragmento SD-gag-RRE-tat/rev mencionado anteriormente en el sitio XhoI-NotI. El plásmido obtenido mediante el método descrito anteriormente se utilizó como vector empaquetamiento pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev.

#### <Construcción de vectores de transferencia génica>

Utilizando de pSA212 como molde, se llevó a cabo la PCR para amplificar la región LTR 5' derivada de SIVagm TYO1 (8547 a 9053 + 1 a 982; que contenía un sitio KpnI y un sitio EcoRI en los extremos 5' y 3', respectivamente) utilizando un par de cebadores 5-1F y 5-1R; la región LTR 3' (8521 a 9170; que contenía los sitios NotI y BamHI en el extremo 5' y un sitio SacI en el extremo 3') utilizando un par de cebadores 5-3F y 5-3R; y la secuencia de RRE (7380 a 7993; que contenía los sitios EcoRI y SacI en los extremos 5' y 3', respectivamente) utilizando un par de cebadores 5-2F y 5-2R. La región promotora de CMV (1 a 600; que contenía los sitios SacII y NotI en los extremos 5' y 3', respectivamente) derivada de pEGFPN2 (Clontech) se amplificó utilizando un par de cebadores 6F y 6R. Los fragmentos de ADN se digirieron en sus extremos. Después de la purificación, se insertaron la LTR 5', RRE, el promotor de CMV, y la LTR 3' en este orden en pBluescript KS+ en el sitio KpnI-SacI mediante ligación. Se insertó un fragmento de NotI que contenía el gen de la  $\beta$ -galactosidasa derivado de pCMV $\beta$  (Clontech) como gen informador en el sitio NotI. El plásmido resultante se digirió con KpnI y SacI para obtener un fragmento de ADN que contenía la región desde la LTR 5' a la LTR 3'. El fragmento se insertó en un vector de control pGL3 en el sitio KpnI-SacI. El plásmido resultante se utilizó como el vector de transferencia génica pGL3C/5' LTR.U3G2/rREC/s/CMV F  $\beta$ -gal/WT 3' LTR.

Adicionalmente, se amplificaron la región del promotor de CMV derivada de pEGFPC2 (Clontech) y la región que codificaba EGFP (1 a 1330; que contenía un sitio SacII en el extremo 5' y sitios NotI, BamHI, y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3') mediante PCR utilizando un par de cebadores 6F y 6R y utilizando pEGFPC2 como molde. Se digirieron los cuatro tipos de fragmentos de PCR con las enzimas de restricción KpnI y EcoRI, EcoRI y SacII, BamHI y SacI, y SacII y BamHI, respectivamente. Después de ser purificado, se insertaron los fragmentos de la LTR 5', RRE, EGFP con el promotor de CMV, y LTR 3' por este orden en pBluescript KS+ entre KpnI y SacI mediante ligación (PBS/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR). El plásmido pBS/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' se digirió con KpnI y SacI para preparar un fragmento de ADN que contenía la región de la LTR 5' a la LTR 3'. El fragmento se insertó en pGL3 (Promega) como vector de control en el sitio KpnI-SacI para construir un vector (pGL3C/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR).

#### <Modificación de la LTR 5'>

Se amplificó un fragmento que contenía la región gag (9039 a 9170 + 1 a 982), aguas abajo de la caja TATA de la LTR 5' mediante PCR utilizando los cebadores 9-1F, 2F, 3F y 9R y utilizando pSA212 como molde. El promotor de citomegalovirus L CMV (derivado de pCI (Promega); nucleótidos 1 a 721) se amplificó mediante PCR utilizando un par de cebadores de 10-1F y 10-1R. Un fragmento que contenía una región aguas abajo de la caja TATA de la LTR 5' se combinó con el fragmento que contenía el promotor. Se preparó un fragmento de ADN que contenía un promotor quimérico del promotor y la 5' LTR mediante PCR utilizando la mezcla como molde y un cebador (10-1F) colocado en el lado 5' del promotor y otro cebador (9R) situado en el lado 3' de la LTR 5'. El fragmento de ADN resultante se insertó en el vector de transferencia génica (pGL3C/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVF  $\beta$ -gal/WT3' LTR) en el sitio KpnI-EcoRI para preparar pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF  $\beta$ -gal/WT3' LTR. De un modo similar, también se insertó el fragmento de ADN obtenido mediante el experimento de PCR descrito anteriormente en el vector pGL3C/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR en el sitio KpnI-EcoRI para preparar pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR.

#### <Preparación del vector SIN (vector de autodesactivación) modificado en LTR 3'>

Se amplificó un fragmento de ADN que contenía 27 pb en el extremo 5', 15 pb en el extremo 3', y la región R de la región U3 de la LTR 3' mediante PCR utilizando un par de cebadores 11F y 11R y utilizando pSA212 como molde. Este fragmento se insertó en el sitio Sall-SacI del vector de transferencia génica pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF  $\beta$ -gal/WT3' LTR, que se había preparado para que contuviera el promotor quimérico en la Sección anterior, para preparar pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF  $\beta$ -gal/3' LTR $\Delta$ U3. De un modo similar, este fragmento se insertó



también en pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR en el sitio Sall-Sacl para preparar pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTRΔU3.

<Preparación del plásmido construido y confirmación de la estructura>

5 El plásmido se transformó en DH5α (Toyobo) mediante el método convencional, y se incubó en placas de agar. La PCR se llevó a cabo utilizando las colonias emergentes como moldes y cebadores capaces de reconocer las secuencias de ADN del fragmento de ADN insertado y una porción correspondiente al sitio de inserción del plásmido. La PCR se realizó utilizando PLATINUM PCR Supermix (Gibco BRL). La presencia y el tamaño de los productos amplificados se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa para seleccionar los clones que contenían los insertos deseados. Cada clon se cultivó en 10 ml de medio de cultivo LB, y después, el plásmido se purificó con un Kit QIAprep Miniprep (QIAGEN). Los plásmidos purificados se trataron con enzimas de restricción para digerir ambos extremos de los fragmentos de ADN insertados y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa para confirmar el tamaño de los fragmentos de ADN. Los clones en los que se confirmó que los plásmidos contenían un fragmento de inserto del tamaño esperado se cultivaron en 100 ml de medio de cultivo LB. Los plásmidos se purificaron con un Kit QIAGEN Plasmid Maxi (QIAGEN). Los plásmidos en los que se había insertado un fragmento amplificado mediante PCR se purificaron a partir de 3 o más clones y se secuenciaron, y las secuencias determinadas se compararon con las de pSA212 para seleccionar los clones que no contenían ninguna mutación.

<Recolección de vectores>

20 Las células 293T se cultivaron en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/pocillo, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se reemplazó por 800 μl/pocillo de Opti MEM antes de la transfección. Después se disolvieron 300 ng del vector de transferencia génica anteriormente mencionado, 600 ng del vector de empaquetamiento anteriormente mencionado, y 100 ng del plásmido de expresión pVSV-G para VSV-G (Clontech) en 100 μl de Opti MEM en cada pocillo, se añadieron a esto 6 μl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron a la mezcla 100 μl de Opti MEM que contenía 4 μl de reactivo LIPOFECTAMINE (Gibco BRL). La mezcla resultante se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se añadió gota a gota a las células 293T mencionadas anteriormente. Las células tratadas se agitaron suavemente y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió 1 ml de D-MEM que contenía suero bovino inactivado al 20% a cada pocillo, y la placa se incubó en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 12 horas. Después de cambiar el medio de cultivo por 2 ml/pocillo de D-MEM que contenía suero bovino inactivado al 10%, la placa se incubó durante 24 horas. A continuación, se recogió el sobrenadante del cultivo y se filtró con un filtro con poros de 0,45 μm de diámetro. El sobrenadante filtrado se usó en experimentos posteriores.

<Transferencia génica mediada por el vector SIVagm>

35 Las células 293T se cultivaron en placa en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células/pocillo, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se retiró, y se superpuso sobre las células 1 ml de la disolución que contenía la disolución del vector a la cual se había añadido polibreno (Sigma) a una concentración final de 8 μg/ml. Las células se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas para lograr la transfección del vector. Después de tres horas, se añadió 1 ml del medio de cultivo a las células. Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo. Al día siguiente, cuando el vector utilizado era el vector de expresión de β-Gal, se llevó a cabo la tinción utilizando X-gal como sustrato con un Kit de Tinción β-Gal (Invitrogen), y se observó la expresión de la β-galactosidasa en las células diana bajo un microscopio óptico. Sin embargo, cuando el vector utilizado fue el vector de expresión de EGFP, la expresión se analizó en un microscopio de fluorescencia.

<Titulación del Vector>

45 La titulación del vector se llevó a cabo mediante el cálculo del número de células en las que se había introducido un gen utilizando 1 ml de la disolución del vector. Las células 293T se cultivaron en placa en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/placa, y se incubaron durante 48 horas. Mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente, se llevó a cabo la infección de las células con 1 ml de la disolución del vector. La tinción con X-gal se llevó a cabo 48 horas después de la infección. Se determinó el valor medio para el número de células que contenían el gen transferido en un campo visual a partir de tres campos visuales diferentes bajo un microscopio óptico con un aumento de 200 veces, y se multiplicó por el coeficiente de 854,865 que había sido determinado en base al área del campo visual y el área de la placa para determinar el título. La unidad de título se definió como unidad de transducción (U.T.)/ml. Además, se cuantificó la proteína p27 en la disolución del vector utilizando un kit de EIA para el antígeno central de SIV (Coulter).

<Evaluación de vectores>

55 Se pronosticó que el aumento de la actividad del promotor 5' en el vector de transferencia génica daba como resultado un aumento de los niveles de transcripción del ARN y, que mejoraba la eficacia de empaquetamiento y por lo tanto aumentaba el título del vector. De este modo, los vectores en los que el promotor 5' había sido reemplazado se evaluaron basándose en la eficacia de la transferencia génica en células 293T. La transferencia génica se llevó a

cabo mediante el mismo procedimiento que se había descrito anteriormente, y la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa se visualizó mediante tinción con X-gal, que estuvo seguida de observación bajo un microscopio óptico.

Se preparó un vector de SIV SIN basándose en un vector de transferencia génica SIN cuyo promotor LTR 3' se había suprimido. También se preparó un vector de SIV basado en un vector de transferencia génica que contenía la LTR 3' de tipo salvaje original. Se comparó la eficacia de la transferencia a las células 293T entre los dos tipos de vectores. También se determinó la cantidad de proteína p27 para comparar las eficacias de transferencia normalizadas con la cantidad de proteína. Además, se confirmaron la consecución de la transferencia del gen EGFP a células 293T con el ciclo celular detenido mediante irradiación, y las células SH-SY5Y diferenciadas terminalmente por ácido retinoico mediante observaciones en el microscopio de fluorescencia.

<Resultados obtenidos mediante transferencia génica a células 293T>

El gen de la  $\beta$ -galactosidasa se introdujo en células 293T derivadas de riñón fetal humano utilizando el vector de SIVagm. Las células que contenían el gen transferido se tiñeron utilizando X-gal como sustrato. Como se muestra en la Fig. 5, se detectaron células teñidas de azul, lo que indica que el gen de la  $\beta$ -galactosidasa se había expresado en las células. De acuerdo con el resultado experimental, la eficacia de la transferencia génica fue de 0,5 a  $1 \times 10^6$  U.T. con 1 ml de disolución de vector. La cantidad de p27 en la disolución de vector fue de 0,5 a  $1 \mu\text{g/ml}$ , y la eficacia de la transferencia por 100 ng de p27 fue de  $10^5$  U.T.

<Evaluación del funcionamiento del vector SIN>

La eficacia de transferencia del vector SIN se comparó con la de un vector convencional que contenía LTR 3' de tipo salvaje preparado en las mismas condiciones. Mientras que el título de vector convencional fue de 2,4 a 2,8 U.T./ml, el del vector SIN fue 2,5 a 2,9 U.T./ml, por lo que la eficacia de transferencia del vector SIN fue de 105% cuando la eficacia del vector convencional se tomó como 100%. Adicionalmente, se determinó la relación entre la eficacia de la transferencia y la cantidad de proteína p27 mediante la medición de la eficacia de la transferencia a las células 293T y el análisis de la cantidad de p27 mediante EIA, la eficacia de vector SIN fue de  $7 \times 10^5$  U.T. por 100 ng de p27.

El gen de EGFP fue transferido por el vector SIN a células 293T con el ciclo celular detenido y a células SH-SY5Y diferenciadas terminalmente. Las células 293T se cultivaron en DMEM que contenía FCS al 10% en  $\text{CO}_2$  al 10% a  $37^\circ\text{C}$ . El ciclo de las células se detuvo en la fase G1-S mediante la adición de afidicolina (Calbiochem-Novabiochem International, Inc.) a una concentración final de  $20 \mu\text{g/ml}$  (Huberman, J. A. et al, Cell: Vol. 23, 647-648. 1981; Byrnes, J. J., Mol. Cell. Biochem.: Abril, 62 (1):13-24. 1984). La detención en la fase G2-M se logró mediante la irradiación de 4000-rad de rayos X a  $2 \times 10^7$  células (Kastan, M. B. et al, Cell.: 13 de noviembre 71 (4):587-97. 1992). Veinticuatro horas después del tratamiento para la detención de la célula, las células se cultivaron en placa en una placa de cultivo de 6 pocillos (Sumilon) recubierta con colágeno de tipo I a una densidad celular de  $1 \times 10^6$ /Pocillo. Al cabo de 24 horas, se llevó a cabo la transferencia génica. Alternativamente, se cultivó la línea celular de neuroblastos humanos SH-SY5Y (Koshizawa, S. H. et al., Cancer Lett.: 1 de enero, 111 (1-2), 117-25. 1997) en RPMI 1640 que contenía suero de ternera inactivado al 10% en  $\text{CO}_2$  al 5% a  $37^\circ\text{C}$ , y se añadió ácido todo-transretinoico (Sigma) al medio de cultivo a una concentración final de  $5 \mu\text{M}$ . Las células se incubaron durante 7 días, y después se llevó a cabo la transferencia génica (Odelstad, L. et al., Brain Res.: 9 de noviembre, 224 (1), 69-82. 1981).

El panel superior de la Fig. 6 muestra un patrón de expresión de EGFP en células 293T observado con microscopía de fluorescencia. Se reconoció una expresión del gen de alta eficacia. El panel inferior de la Fig. 6 muestra la expresión de EGFP en SH-SY5Y. Se encontró expresión de EGFP en células que tenían neuritas que parecía se habían diferenciado a neuronas.

Se confirmó que el vector SIVagm preparado en este Ejemplo mediaba la transferencia génica de una manera altamente eficaz en células en cultivo. Se supone que la probabilidad de reconstitución de las partículas de virus de tipo salvaje en el vector de empaquetamiento después de la co-transfección de los tres tipos de plásmidos independientes es muy baja. Además, se ha confirmado que el propio SIVagm TYO-1, que se utiliza como base para el vector, no presenta ninguna patogenicidad en términos de infección tanto natural como experimental (Ohta, Y. et al., Int. J. Cancer: 41, 115-22, 1988; Miura, T. et al, J. Med. Primatol.: 18 (3-4), 255-9. 1989; Honjo, S. et al, J. Med. Primatol. 19 (1), 9-20, 1990). Además, el vector puede ser muy seguro, porque en general los lentivirus son altamente específicos para la especie y tienen sólo patogenicidad débil para especies animales distintas de sus especies diana originales (Novembre, F. J. et al, J. Virol.: 71 (5), 4086-91. 1997).

En este Ejemplo, se ha eliminado la secuencia señal de empaquetamiento del constructo del vector de empaquetamiento, y por lo tanto el ARN que codifica las proteínas virales no está empaquetado en partículas. La unión de la proteína rev a RRE induce la transferencia de ARN al citoplasma y la supresión de empalme, lo que da como resultado la expresión de proteínas virales y el empaquetamiento del ARN completo en partículas de virus. Por lo tanto, el RRE insertado tanto en el vector de empaquetamiento como en el vector de transferencia génica puede regular el empalme de ARNm del vector de empaquetamiento, que de este modo puede permitir la expresión de todos los genes. A continuación, el ARNm del vector de transferencia génica se puede transferir al citoplasma, y empaquetar en partículas del vector. Hay algunos casos en los que vif, vpr/x han sido excluidos de los vectores de VIH-1 (Dull, T. et al, J. Virol.: Nov, 72 (11), 8463-71. 1998), y esto sugiere la posibilidad de que las proteínas no sean

esenciales para el empaquetamiento y el funcionamiento de las partículas de vector. Se cree que vpr es un factor responsable de la infectividad de las células que no están en división (Heinzinger, N. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: Jul 19, 91 (15), 7311-5, 1994); un informe describe que el tipo de célula, al cual puede transferir genes el vector de VIH-1, varía en función de la presencia de vpr (Kim, V. N. et al., J. Virol.: Enero, 72 (1), 811-6. 1998).  
 5 También se ha informado de que nef, que se había excluido completamente del vector de empaquetamiento en los Ejemplos descritos en la presente memoria, puede ser una proteína causante de la inmunodeficiencia mediada por SIV basándose en la evidencia obtenida mediante los experimentos de infección de monos (von Gegerfelt, A. S. et al., J. Virol. 73, 6159-65, 1999; Kestler, H. W. 3<sup>a</sup>, Naidu, Y. N., Kodama, T., King, N. W., Daniel, M. D., Li, Y., Desrosiers, R. C. Use of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus for pathogenesis studies., J. Med. Primatol. 18 (3-4): 305-9, 1989). La secuencia correspondiente se ha eliminado completamente del vector SIVagm construido en este Ejemplo; por lo tanto, incluso si se formaran las partículas de virus reconstituidas que contenían genes virales derivados del vector de empaquetamiento, el riesgo de patogenicidad para tales partículas se habría reducido aún más.

El vector basado en lentivirus puede transferir genes a células en cultivo con el ciclo celular detenido y neuronas debido a que el lentivirus original es infeccioso para las células que no están en división (Naldini, L. et al, Science: 272 263-267, 1996; Sutton, R. E. et al., J. Virol., 73 (5), 3649-60, 1999). Cuando tal vector ha sido seudotipado con VSV-G, a diferencia del SIV original, la infectividad del vector no está limitada a la infección a células CD4- y positivas para el receptor de quimioquina. Se sabe que el receptor de VSV-G es la fosfatidilserina, que es uno de los fosfolípidos, cuyas moléculas están presentes en la superficie de diversos tipos de células (Schlegel, R. et al., Cell, 32 (2), 639-46, 1983). De este modo, el vector SIVagm que ha sido seudotipado con VSV-G tiene una gama mucho más amplia de la infectividad. Se prevé que cuando los virus que son seudotipados con proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina se preparan basándose en este vector, estos son capaces de transferir genes a casi todos los tipos de células animales con un alto grado de eficacia.

#### [Ejemplo 6] Preparación de virosomas

25 La siembra de SeV de tipo salvaje (cepa Z) se inoculó en huevos fértiles (huevos de 10 días), y los huevos se cultivaron a 35,3°C durante tres días. A continuación, se recogió el fluido corio-alantoideo de los huevos. Después de la centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se centrifugó a 10.000 rpm durante una hora para precipitar las partículas de virus. El sedimento se resuspendió en BSS, y superpuso sobre una disolución con un gradiente de densidad de sacarosa (30%/50%), seguido de centrifugación a 25.000 rpm durante una hora.  
 30 Se recogió una banda de partículas de virus formada en el límite entre la sacarosa al 30% y al 50%, y después, se diluyó con un gran volumen de BSS. A continuación, la muestra se centrifugó a 9000 rpm durante una hora para precipitar las partículas de virus. Las partículas de virus resultantes se resuspendieron en BSS y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

35 Se prepararon virosoma de F-HN y virosoma de F a partir del virus Sendai obtenido de acuerdo con el método descrito en la referencia (Bagai et al., 1993, Biochem. Biophys. Acta 1152, 15-25). Específicamente, el virus Sendai se solubilizó con un detergente y, a continuación se eliminaron las RNP insolubles mediante centrifugación. Las partículas se reconstituyeron retirando el detergente de la disolución cuando las proteínas F y HN, y los lípidos (lípidos de la envoltura) se habían solubilizado para preparar el virosoma de F-HN. La preparación se llevó a cabo en las mismas condiciones que las utilizadas en el Ejemplo 7 excepto que la concentración de Triton X-100 fue de 1% (v/v) antes de la centrifugación. El virus Sendai se trató previamente con DTT (ditiotreitól) para reducir la proteína HN, y se solubilizó con detergente mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. La proteína HN insoluble resultante junto con las RNP se eliminaron mediante centrifugación. Las partículas se reconstituyeron para preparar el virosoma de F mediante la eliminación del detergente de la solución por medio del mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente.

45 Los virosomas resultantes exhibieron diámetros de partículas heterogéneos. Por lo tanto, los virosomas se separaron en dos fracciones que contenían las partículas de diferente tamaño a través de centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos (virosoma pequeño: diámetro medio de partícula = 140 nm; virosoma grande: diámetro medio de partícula = 1,4 µm). Los virosomas fraccionados se evaluaron mediante SDS-PAGE. En el virosoma F-HN se detectaron tanto proteína F como proteína HN; en el virosoma F, proteína F. De este modo, se confirmó que casi se habían obtenido los virosomas deseados (Fig. 7).  
 50

El virosoma preparado como se ha descrito anteriormente o el virus Sendai inactivado mediante irradiación con UV se fusionaron con virus SIV que expresaba EGFP, que se había preparado y enriquecido mediante el método descrito en el Ejemplo 7 (3) en condiciones de 37°C durante dos horas con la composición indicada en la siguiente Tabla. Se ha informado de que la eficiencia de fusión entre VSV-G y liposomas es mayor a valores de pH débilmente ácidos (Yamada, S. et al., 1986, Biochemistry, 25, 3703-3708). Por lo tanto, la fusión se llevó a cabo a pH 5,5 o pH neutro.  
 55

Tabla 3

Condición	SIV			SeV		
	Titulación (UT/ml)	Tampón	Volumen (µl)	Virus	Tampón	Volumen (µl)
1	$1 \times 10^8$	BSS	50	Inactivado con UV SeV $1 \times 10^9$ ufp/ml	BSS	50
2	$1 \times 10^8$	pH 5,5 ácido cítrico	50	Inactivado con UV SeV $1 \times 10^9$ ufp/ml	pH 5,5 ácido cítrico	50
3	$1 \times 10^8$	BSS	50	virosoma de FHN (pequeño)	BSS	50
4	$1 \times 10^8$	BSS	50	virosoma de FHN (grande)	BSS	50
5	$1 \times 10^8$	BSS	50	virosoma de F (pequeño)	BSS	50
6	$1 \times 10^8$	BSS	50	virosoma de F (grande)	BSS	50

5 La mezcla preparada como se ha descrito anteriormente se añadió al sobrenadante de cultivo de células HeLa a una MOI = 10. Se llevó a cabo un experimento de control, donde SIV era co-infectado simplemente con el virus de Sendai. En este experimento, en primer lugar, 5 minutos después de que se hubieran añadido SIV al medio de cultivo, se añadió virus Sendai en un volumen 10 veces el volumen de SIV. Después de que se hubieran añadido los virus al medio de cultivo, la mezcla se incubó para la infección durante 10, 30, o 180 minutos. A continuación, el medio de cultivo se cambió por uno de nueva aportación. Cuarenta y ocho horas después del inicio de la infección, se realizó la observación para detectar la fluorescencia de GFP (Fig. 8).

10 De acuerdo con el resultado obtenido, cuando las células HeLa se infectaron solo con SIV y la duración del contacto fue de 30 minutos o más corta, la eficacia de la infección fue muy baja. Se encontró que la mezcla de fusión del SIV y virus Sendai inactivado con UV tenía una tendencia a infectar más rápido que el SIV solo. La eficacia de la infección a pH neutro fue mayor que a un pH de 5,5. Esto ser el resultado de la disminución de la influencia del pH sobre el SIV a niveles neutros.

15 La fusión con el virosoma de F-HN también aumentó la infección, mejorando de ese modo significativamente la eficacia de la infección. El virosoma de F también mejoró la infección eficazmente, pero en un grado menor en comparación con el virosoma de F-HN. Cuando SIV se co-infectó simplemente con el virus Sendai, la eficacia de la infección fue solamente comparable a la de SIV solo.

20 Estos resultados demuestran que la fusión de SIV con el virus Sendai o el virosoma de F-HN aumenta la infectividad de SIV. Además, se sugirió que la proteína HN del virus Sendai contribuía en gran medida al aumento de la eficacia de infección.

#### [Ejemplo 7] Preparación y evaluación del vector de fusión SIV-SeV

##### (1) Preparación de SeV de tipo salvaje

25 La siembra de SeV de tipo salvaje (cepa Z) se inoculó en los huevos fértiles (huevos de 10 días), y los huevos se cultivaron a 35,3°C durante tres días. Después, se recogió el fluido corioalantoideo de los huevos. Después de la centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se centrifugó a 10.000 rpm durante una hora para precipitar las partículas de virus. El sedimento se resuspendió en BSS, y se superpuso sobre una disolución con un gradiente de densidad de sacarosa (30%/50%), seguido de centrifugación a 25.000 rpm durante una hora. Se recogió una banda de partículas de virus formada en el límite entre la sacarosa al 30% y al 50%, y después se diluyó con un gran volumen de BSS. A continuación, la muestra se centrifugó a 9.000 rpm durante una hora para precipitar las partículas de virus. Las partículas de virus resultantes se resuspendieron en BSS y se almacenaron a -80°C para su uso posterior.

##### (2) Reconstitución de virosoma a partir de proteína transmembrana de SeV

###### 1. Virosoma de FHN

35 Se añadieron 0,2 ml de Triton X-100/BSS al 20% (v/v) a 1,8 ml de SeV ( $DO_{540} = 5$ , BSS), y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para solubilizar el SeV. En el Ejemplo 6, los virosomas exhibieron diámetros de partícula heterogéneos. Por lo tanto, la concentración de Triton X-100 se ajustó a 2% (v/v) antes de la centrifugación. Las RNP insolubles se precipitaron mediante centrifugación (a 100.000xg a 4°C durante 1 hora), y a

continuación se recogió el sobrenadante en el que se habían solubilizado las proteínas F y HN. Se añadió al sobrenadante Bio-Bead SM-2 (BIORAD) en tres etapas (0,5 g x dos veces, a temperatura ambiente durante 1 hora; 1 g x una vez, a 4°C durante 15 horas más incubación a temperatura ambiente, 1 hora) para eliminar el detergente mediante adsorción, seguido de la eliminación de las cuentas. De este modo, se obtuvieron aproximadamente 1,5 ml de virosoma de FHN.

2. Virosoma de F

Se añadieron 0,2 ml de ditiotreitól/BSS 30 mM a 2 ml de SeV (DO<sub>540</sub>= 5, BSS), y la mezcla se incubó a 37°C durante dos horas para reducir irreversiblemente la proteína HN. Después de la dilución con BSS, las partículas virales se separaron mediante centrifugación, y se resuspendieron en 1,8 ml de BSS. Se añadieron 0,2 ml de Triton X-100/BSS al 20% (v/v) a la suspensión de virus, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora para solubilizar el SeV. A continuación, se eliminaron las RNP insolubles y la proteína HN reducida mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. Se recogió el sobrenadante en el que se había solubilizado la proteína F. Se obtuvieron aproximadamente 1,5 ml de virosoma de F mediante el mismo procedimiento que se había utilizado para preparar el virosoma de FHN.

3. Virosoma de HN

Se añadieron 2 ml de 150 unidades/ml de tripsina (Sigma)/BSS a 2 ml de SeV (DO<sub>540</sub>= 5, BSS), y la mezcla se incubó a 37°C durante dos horas para digerir la proteína F. A continuación, se añadió 1 mg/ml de inhibidor de tripsina-quimotripsina (Sigma)/BSS a la mezcla de reacción para detener la reacción. Después de la dilución con BSS, se separaron las partículas de virus mediante centrifugación, y se resuspendieron en 1,8 ml de BSS. Se obtuvieron mediante el mismo procedimiento que el utilizado para preparar FHN virosoma aproximadamente 1,5 ml de virosoma de HN en el que la función de la proteína F se había inactivado.

Las características de los tres tipos de virosomas se muestran en la siguiente Tabla. Los datos de actividad de HA que representan la función de las proteínas F y HN, la actividad hemolítica, y los patrones electroforéticos demostraron que se requerían virosomas (Fig. 9).

Tabla 4

	Virosoma de FHN	Virosoma de F	Virosoma de HN
HA	+	-	+
Actividad hemolítica	+	-	-
D.O. <sub>540</sub>	0,480	0,491	0,470
Concentración de proteína (mg/mL)	0,96	0,57	0,78
Diámetro medio de partícula (nm)	143,5	168,9	133,0

(3) Preparación de SIV-LacZ

El SIV que contiene el gen LacZ (SIV-LacZ) se preparó utilizando los siguientes tres tipos de plásmidos.

• Vector de empaquetamiento: pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev

• Vector de transferencia génica:

pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTRΔU3 o

pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β-gal/3LTRΔU3

• plásmido VSV-G: pVSV-G

Se disolvieron 150 µg de vector de empaquetamiento, 300 µg de vector de transferencia génica, y 50 µg de plásmido VSV-G en 75 ml de DMEM. Se añadieron a la disolución 2 ml de reactivo Plus (Life Technologies Oriental, Inc.), y la mezcla resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una suspensión preparada combinando 3 ml de reactivo LipofectAmine (Life Technologies Oriental, Inc.) y 75 ml de DMEM, y la mezcla resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos para formar un complejo de ADN. Se añadieron gota a gota 3 ml de la disolución de complejo de ADN a células 293T (que se habían preparado en 50 placas que contenían FCS/DMEM al 10% a una densidad celular de 2,5 x 10<sup>6</sup> células/placa de 150 mm 2 días antes de la transfección). La transfección se lleva a cabo en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadieron a las células 10 ml de FCS/DMEM al 10%, y después se continuó adicionalmente la incubación. Al cabo de 48 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió y se filtró con un filtro de membrana con poros de 0,45 µm de diámetro. El producto filtrado se centrifugó a 42.500 xg durante 1,5 horas para precipitar las partículas de virus. Los precipitados se combinaron entre sí y se resuspendieron en 15 ml de disolución de transcripción inversa (dNTP 100

$\mu\text{M}$ , espermina 3 mM, espermidina 0,3 mM,  $\text{MgCl}_2/\text{TBS}$  10 mM). La transcripción inversa se llevó a cabo a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas. A continuación, el virus se centrifugó (a  $42.500\times g$  durante dos horas), y las partículas se resuspendieron en  $500\ \mu\text{L}$  de PBS (que contenía FCS al 5% y  $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$  polibreno) para obtener una disolución enriquecida en SIV-LacZ. El título de SIV-LacZ fue aproximadamente de  $5\times 10^8$  U.T./mL (células 293T).

#### 5 (4) Preparación del vector de fusión

Se diluyó SIV-LacZ a  $1\times 10^8$  U.T./ml con BSS. Se añadió a esta solución un volumen igual de una disolución de virosoma/BSS. La mezcla se dejó reposar a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos para la adsorción. A continuación, se llevó a cabo la fusión a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas, y la disolución de reacción se diluyó 10 veces con PBS enfriado en hielo (a una concentración final de SIV de  $5\times 10^6$  U.T./ml). Este SIV se utilizó inmediatamente en los experimentos de infección.

#### 10 (5) Experimentos de infección

Se añadió 1 ml de células 293T en FCS/DMEM al 10% (denominado de aquí en adelante medio de cultivo) a cada pocillo de placas de 12 pocillos a una densidad celular de  $1\times 10^5$  células/pocillo, y las células se cultivaron en  $\text{CO}_2$  al 10% a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Inmediatamente antes de la infección, el medio de cultivo se redujo a 0,5 ml. Se añadió a cada pocillo un vector de fusión que consistía en SIV y el virosoma a una concentración de  $5\times 10^6$  U.T./ml ( $100\ \mu\text{l}/\text{pocillo}$ ), y la mezcla se incubó  $\text{CO}_2$  al 10% a  $37^\circ\text{C}$  durante 10 minutos para la infección. Después de haber lavado los pocillos dos veces con medio de cultivo, se añadieron a cada pocillo 2 ml de medio de cultivo. A continuación, las placas se incubaron adicionalmente. Después de 48 horas, las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con 0,25 ml de tampón de lisis celular (PicaGene LC- $\beta$ ; Toyo Ink). Los productos lisados celulares se centrifugaron a 12.000 rpm durante 3 minutos, y el sobrenadante se diluyó apropiadamente. El nivel de expresión del gen LacZ se determinó utilizando Galacto-Light Plus™ (TROPIX, Inc.). Los datos se presentaron como la actividad relativa de LacZ por  $1\ \mu\text{g}$  de proteína de las células (ULR/mg proteína), que se obtuvo como una media  $\pm$  desviación típica de las mediciones por triplicado.

El nivel de expresión de LacZ fue significativamente mayor con la fusión con el virosoma de FHN que con SIV solo ( $p < 0,05$ ). A diferencia del virosoma de FHN, el virosoma de F no dio como resultado un aumento de los niveles de expresión del gen. El virosoma de HN también tuvo una tendencia a elevar el nivel, pero en menor medida que FHN (Fig. 10).

En los vectores anteriores, la proteína VSV-G SIV y la proteína F del virosoma son responsables de la fusión. El pH óptimo para la fusión utilizando la proteína VSV-G se encuentra dentro de un intervalo de pH débilmente ácido. Por otro lado, se ha informado que la proteína F participa en la fusión incluso a un pH neutro. En este Ejemplo, la fusión se logró a un pH neutro, y por lo tanto se supuso que la proteína F de SeV era responsable de la mayor parte de la fusión. Se ha informado de que la fusión entre SeV y el liposoma es viable, siempre que la proteína F sea funcionalmente activa. De este modo, se podría formular la hipótesis de que cuando la eficacia de la fusión basada en el virosoma de FHN es comparable a la fusión del virosoma de F, el aumento del nivel de la expresión génica por virosoma de FHN solo se puede atribuir a la contribución sustancial de HN adicional. El virosoma de HN también mostró un efecto a cierto nivel, lo que sugiere que la fusión basada en VSV-G se producía hasta cierto punto, lo que daba como resultado la integración de la proteína HN en SIV.

Por otro lado, el efecto de la simple co-infección de SIV y virosoma fue comparable a la de SIV solo (Fig. 10). Estos hallazgos sugieren que la fusión se estableció a través de la incubación a  $37^\circ\text{C}$  de la mezcla que contenía los dos, y por lo tanto las proteínas de membrana de SeV se integraron en la envoltura de SIV; la proteína HN contribuyó principalmente a la mejora de la tasa de infección.

#### [Ejemplo 8] Preparación y análisis del funcionamiento del vector de lentivirusseudotipo HN

##### 1. Cultivo de células

Se cultivaron células 293T (línea celular de riñón fetal humano) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)-alto contenido de glucosa (Gibco BRL) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en  $\text{CO}_2$  al 10% a  $37^\circ\text{C}$ .

##### 2. Preparación del vector

Se cultivaron en placa las células 293T en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de  $5\times 10^5$  células/pocillo, y después se incubaron en  $\text{CO}_2$  al 10% a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por  $800\ \mu\text{l}/\text{pocillo}$  de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. A continuación se utilizaron las células en la transfección. En las combinaciones indicadas en la Tabla 5 siguiente, se disolvieron 1200 ng del vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTRΔU3 o pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF  $\beta$ -gal/3LTRΔU3), 360 ng de vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), 120 ng de plásmido de expresión de VSV-G pVSV-G (Clontech), 240 ng de cada uno de los plásmidos de expresión de las proteínas HN, F, y M del virus Sendai, pCAGGS-HN, pCAGGS-F, y pCAGGS-M, en  $100\ \mu\text{l}$  de Opti MEM en cada pocillo. A continuación, se añadieron al pocillo  $6\ \mu\text{l}$  de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó

5 reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una disolución obtenida diluyendo 4 µl de reactivo LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 100 µl de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293T preparadas anteriormente mientras que se agitaban suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió a cada pocillo 1 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 15 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió y se filtró con un filtro con un diámetro de 0,45 µm y la disolución resultante se utilizó como una disolución de vector.

Tabla 5

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
PV	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
GTV	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
VSV-G		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
HN		■		■		■		■		■		■
F			■		■		■		■		■	
M				■		■		■		■		■

10 (En esta Tabla, los plásmidos añadidos se indican en negro. "PV" indica vector de empaquetamiento pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev, "GTV" vector de transferencia génica

15 pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTRΔU3 o pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β-gal/3LTRΔU3; "VSV-G", plásmido de expresión de VSV-G pVSV-G; "HN", "F" y "M" indican los plásmidos que expresan la proteína HN-, la proteína F, y proteína M del virus Sendai pCAGGS-HN, pCAGGS-F, y pCAGGS-M, respectivamente).

3. Preparación a gran escala y enriquecimiento de vector

20 Las células 293T se cultivaron en placa en fuentes de plástico de 15 cm a una densidad celular de 5 x 10<sup>6</sup> células/placa, y se cultivaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 10 ml/fuente de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. Las células se utilizaron después en la transfección. En las combinaciones indicadas en la Tabla 5 anterior, se disolvieron 8 µg de vector de transferencia génica, 2,4 µg de vector de empaquetamiento, 0,8 µg de plásmido de expresión de VSV-G pVSV-G (Clontech), 1,6 µg de cada uno de los plásmidos de expresión de las proteínas HN y F del virus Sendai, pCAGGS-HN, pCAGGS-F, y pCAGGS-M, en 1,5 ml de Opti MEM en cada fuente. A continuación, se añadieron a cada fuente 40 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se

25 añadió a la mezcla una solución obtenida diluyendo 60 µl de reactivo de LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 1,5 ml de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla se añadió gota a gota a las células 293 T preparadas anteriormente mientras que se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadieron a cada pocillo 10 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 15 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después del cultivo en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió y se filtró con un filtro con poros con un diámetro de 0,45 µm, seguido de centrifugación a 42.490 xg (TOMY SRX-201, TA21BH) a 4°C durante 90 minutos. El sedimento resultante se disolvió en 1/100 el volumen de una disolución de transcripción inversa (TBS, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ESPERMINA 3 mM, SUPERMIDINE 0,3 nM, dNTP 100 mM), y la disolución se incubó a 37°C durante dos horas. Después de la reacción de transcripción inversa, la reacción se centrifugó a 42.490 xg (TOMY SRX-201, TA21BH) a 4°C durante dos horas, y el sedimento resultante se disolvió en PBS (FCS al 5%, 2 µg/ml de polibreno). La disolución se almacenó a -80°C hasta su uso.

30

35

40 Cuando los tres tipos de plásmidos del vector de empaquetamiento, el vector de transferencia génica, y el vector de expresión de la proteína de la cubierta se co-transfectan a células, el ARNm se transcribe a partir del vector de transferencia génica; el reconocimiento de la secuencia Ψ por una proteína viral proporcionada por el vector de empaquetamiento permite el empaquetamiento del ARN en las partículas de vector. A continuación, se forman finalmente partículas de vector por medio de pseudotipado con la proteína de la envoltura proporcionada por el vector de proteína de la cubierta. El vector de virus pseudotipo preparado se sometió a ensayo para determinar la capacidad de lograr la transferencia génica a las células.

<Titulación del vector y detección de las células que contienen el gen transferido>

45 La transferencia génica mediada por vectores a células 293T se llevó a cabo mediante el método anteriormente mencionado. El título se determinó basándose en el número de células en las que se habían introducido los genes utilizando 1 ml de la disolución del vector. Cuando se utilizó un gen que codifica el vector de transferencia de EGFP como gen informador, las células diana se fijaron con PBS (Invitrogen) que contenía formaldehído 2% y glutaraldehído al 0,2% a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se lavaron una vez con PBS; se evaluó la

expresión de EGFP basándose en observaciones en un microscopio de fluorescencia invertido (DMIRB (SLR), Leica).

5 Los tres tipos de plásmidos del vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), el vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTRΔU3), y el vector de la proteína de la cubierta derivado de virus Sendai (pCAGGS-F , pCAGGS-HN, y pCAGGS-M) se co-transfectaron a células en las combinaciones indicadas en los apartados (2) a (5) de la Tabla 5. En ninguna de estas combinaciones, se transfirió el gen a las células 293T. Sin embargo, la transferencia génica se logró con éxito mediante la co-expresión con VSV-G. Estos descubrimientos demostraron que, cuando se preparaba con proteínas F y HN solas, el vector SIVagm seudotipo no mediaba una eficacia suficientemente alta de transferencia génica, pero se podían producir vectores virales seudotipo que mostraban una mayor infectividad mediante la ayuda de proteínas de envoltura viral coexistentes, tales como VSV-G, que tenía infectividad para las células humanas.

10 El gen EGFP se introdujo en células 293T utilizando el vector SIVagm seudotipo, y se determinó el título de vector; el título de vector viral preparado fue de 0,5 a  $1 \times 10^5$  U.T. por ml de la disolución de vector. El título de vector viral enriquecido mediante centrifugación fue tan alto como  $1,0 \times 10^7$  U.T./ml. Esto demostró que el vector SIVagm seudotipado con las proteínas F y HN del virus Sendai se podía enriquecer mediante centrifugación.

[Ejemplo 9] Administración *in vivo* de vector viral seudotipo

15 Las células de la mucosa del epitelio de la tráquea en las que es difícil introducir genes con un vector viral convencional deben ser pretratadas para eliminar las barreras físicas en el momento de la introducción. De este modo, cuando se pretende introducir genes en tales células mediante el método en el que se utiliza el vector de VIH pseudotipo VSV-G, solo se garantizan efectos suficientes después de que las células sean dañadas con dióxido de azufre, etc. (L. G. Johnson et al, Gene Therapy: 7, 568-574. 2000). De este modo, se sometió a ensayo si el vector SIVagm pseudotipado con las proteínas F y HN del virus Sendai podía transferir genes con alta eficacia a las células de la mucosa del epitelio de la tráquea sin dañar las células.

20 Se anestesiaron ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad (macho) mediante inhalación de seboflureno, y se les administró por vía intranasal el vector de SIV pseudotipo FHN que expresaba EGFP (vector expresión de EGFP en el apartado (11) de la Tabla 5) (referido como SIV-F/HN/M-EGFP), que se había producido mediante el procedimiento descrito anteriormente. Los tejidos se embebieron en compuesto OCT y se cortaron en secciones congeladas; las secciones se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Zeiss).

25 Se administraron intranasalmente 100  $\mu$ l de SIV-F/HN/M-EGFP ( $10^8$  U.T.), al cabo de 3 días se observó la tráquea. Se detectó fluorescencia por EGFP en células epiteliales de la tráquea (Fig. 11). En los mismos individuos, también se confirmó que el epitelio de la mucosa expresaba el gen, y se encontró que la fluorescencia estaba localizada en el epitelio ciliado pseudoestratificado en la membrana mucosa septonasal (Fig. 12).

[Ejemplo 10] Expresión persistente de genes foráneos mediada por administración *in vivo* de vector de virus pseudotipo

30 Se produjo un retrovirus pseudotipo que contenía las proteínas F y HN usando un vector de transferencia génica que expresaba EGFP mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. Específicamente, se produjeron MSCV pseudotipo (MSCV-F/HN/M-EGFP) correspondiente al apartado (9) de la Tabla 2 y SIV pseudotipo (SIV-F/HN/M-EGFP) correspondiente al apartado (11) de la Tabla 5. Como control se utilizó SIV pseudotipo VSV-G (SIV-VSV-EGFP) correspondiente al apartado (1) de la Tabla 5. Los vectores virales de expresión de EGFP se administraron a los ratones por vía intranasal, y se prepararon secciones de tejidos de la membrana mucosa nasal 90 días después de la administración para observar la expresión de EGFP.

35 De acuerdo con los resultados obtenidos, cada vector utilizado, dio como resultado la expresión de EGFP; se detectaron intensas señales de fluorescencia de EGFP en los casos de la administración de MSCV-F/HN/M-EGFP y SIV-F/HN/M-EGFP que contenían las proteínas F y HN. En particular, la administración del vector SIV-F/HN/M-EGFP proporcionó una señal fluorescente más intensa que la observada con los otros vectores. De este modo, se confirmó que el vector tenía la capacidad de transferir genes con una alta eficacia (Fig. 13).

[Ejemplo 11] Construcción de un plásmido de expresión novedoso para las proteínas de la envoltura del virus Sendai

[1] Construcción del plásmido de expresión para la proteína HN con el dominio citoplásmico sustituido

40 Se construyó un plásmido de expresión de HN, donde el dominio citoplásmico de la proteína HN se había reemplazado por el dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura del SIV (Fig. 14). Se recogieron tres pares de oligonucleótidos sintéticos (Xho+Xma/Xma-Xho, Xma+131/135-Xma, 132+Bam/Bam-136), y a continuación se insertó cada uno en pBluescript KS+ (Stratagene) en el sitio XhoI-BamHI. Se insertaron en pCAGGS un fragmento purificado que contenía el oligonucleótido sintético, que se había obtenido mediante la digestión del plásmido recombinante anteriormente descrito con XhoI y DraIII, o un fragmento purificado que contenía una porción 3' de la proteína HN, que se había obtenido mediante la digestión del plásmido de expresión de la proteína HN pCAGGS-HN con DraIII y Bsu36I, (Gene, vol. 108, págs.193-200, 1991) en el sitio XhoI-Bsu36I. El plásmido obtenido mediante el



método descrito anteriormente se utilizó como plásmido de expresión para proteína HN con el dominio citoplásmico sustituido de SIV, pCAGGS-SIVct/HN.

[2] Construcción del plásmido de expresión para la proteína HN con un dominio citoplásmico de SIV añadido

5 Se construyó un plásmido de expresión de HN, donde el dominio citoplásmico de la proteína de la envoltura de SIV se había añadido a la proteína HN (Fig. 15). Se amplificó mediante PCR una región que contenía el dominio citoplasmático de la proteína de la envoltura de SIV y una porción de la proteína HN utilizando los cebadores FSIVhn y RhnSIV, y utilizando como molde el plásmido de expresión anteriormente mencionado para la proteína HN con el dominio citoplásmico sustituido. Después de que el fragmento amplificado fuera digerido con XhoI y AclI, se insertaron los tres pares de oligonucleótidos sintéticos preparados en el apartado [1] anterior en pBluescript KS+ (Stratagene) en el sitio XhoI-AclI para reemplazarlo por el fragmento que contenía el dominio citoplásmico de la envoltura de SIV .

15 Se insertó en pCAGGS un fragmento purificado que contenía el oligonucleótido sintético, que se había obtenido mediante la digestión del plásmido recombinante con XhoI y DraIII, o un fragmento que contenía una porción 3' de la proteína HN, que se había obtenido mediante digestión del plásmido de expresión de la proteína HN pCAGGS-HN con DraIII y Bsu36I, (Gene, vol. 108, págs. 193-200, 1991) en el sitio XhoI-Bsu36I. El plásmido obtenido por el método descrito anteriormente se utilizó como el plásmido de expresión para la proteína HN con un dominio citoplásmico SIV añadido, pCAGGS-SIVct +HN.

[3] Construcción del plásmido de expresión de la proteína F que carece del dominio citoplásmico

20 Se construyeron plásmidos de expresión de la proteína F, cada uno de los cuales contenía los primeros primera 27, 14, o 4 residuos del extremo 5' de los aminoácidos del dominio citoplásmico de la proteína F y por lo tanto carecían de 15, 28, o 38 residuos de aminoácidos, respectivamente (Fig. 16). Cada uno de los fragmentos que carecían de 15, 28, y 38 aminoácidos, respectivamente, se amplificó mediante PCR utilizando los pares de cebadores, XhFF y NotF1650, NotF1611 y NotF1581, y utilizando como molde el plásmido pBluescript KS+/SmaI/F, en el que toda la región de la proteína F se había insertado en pBluescript KS+ (Stratagene) en el sitio SmaI. Los fragmentos amplificados se digirieron con XhoI y NotI, y a continuación se insertó cada uno en el sitio XhoI-NotI del plásmido que se había construido a partir de pCAGGS (Gene, vol. 108, págs. 193-200, 1991) mediante la inserción de un conector XhoI/NotI en el sitio EcoRI para construir los plásmidos (deleción de 15 aminoácidos: pCAGGS-Fct27; deleción de 28 aminoácidos: pCAGGS-Fct14; deleción de 38 aminoácidos: pCAGGS-Fct4).

30 [4] Construcción del plásmido de expresión de la proteína F que carece del dominio citoplásmico que contiene el dominio citoplásmico de SIV

35 Se construyeron plásmidos (Fig. 17) mediante la adición de los primeros 11 aminoácidos desde el extremo 5' del dominio citoplásmico de SIV (SIVct11) a plásmidos de expresión de la proteína F que carecías de dominio citoplásmico (los números de aminoácidos en el dominio citoplásmico de la proteína F son los mismos que en los plásmidos preparados en el apartado [3]). Los fragmentos correspondientes a los tres tipos descritos anteriormente que carecían de los aminoácidos, pero que contenían el dominio citoplásmico de SIV añadido se amplificaron mediante PCR utilizando los pares de cebadores XhFF y SA-F1650, y SA-F1611 y SA-F1581, y usando como molde el plásmido pBluescript KS+/SmaI/F, en el que se había insertado toda la región de la proteína F en pBluescript KS+ (Stratagene) en el sitio SmaI. Los fragmentos amplificados se digirieron con XhoI y NotI, y después se insertó cada uno en el sitio XhoI-NotI del plásmido que había sido construido a partir de pCAGGS (Gene, vol. 108, págs. 193-200, 1991) mediante la inserción de un conector XhoI/NotI en el sitio EcoRI para construir los plásmidos (adición de SIVct11 + deleción de 15 aminoácidos: pCAGGS-Fct27/SIVct11; adición de SIVct11 + deleción de 28 aminoácidos: pCAGGS-Fct14/SIVct11, y adición de SIVct11 + deleción de 38 aminoácidos: pCAGGS-Fct4/SIVct11).

[Ejemplo 12] Preparación y análisis de funcionamiento del vector de lentivirus seudotipado con la envoltura del virus Sendai

45 <Cultivo celular>

Se cultivaron células 293T (línea celular de riñón fetal humano) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (Gibco BRL) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C.

50 Se cultivaron células BEAS-2B (línea celular epitelial humana derivada de la tráquea) en una mezcla de Medio Esencial Mínimo (MEM) (Gibco BRL) y RPMI 1640 (proporción de 1:1) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

<Preparación del vector>

55 Se cultivaron en placa células 293T en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de 5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo, y después se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 800 µl/pocillo de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. A continuación se utilizaron las células en

la transfección. En las combinaciones indicadas en la Tabla 6 de más abajo, se disolvieron 1200 ng del vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3), 360 ng de vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), plásmido de expresión proteína HN, F de virus Sendai pCAGGS-SIVct/HN, pCAGGS-SIVct+HN, pCAGGS-Fct4, pCAGGS-Fct14, pCAGGS-Fct27, pCAGGS-Fct4/SIVct11, pCAGGS-Fct14/SIVct11 y pCAGGS-Fct27/SIVct11 en 100 µl de Opti MEM (Gibco BRL) en cada pocillo. Después, se añadieron al pocillo 6 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una disolución obtenida mediante dilución de 4 µl de reactivo LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 100 µl de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293T preparadas anteriormente mientras que se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación, en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió a cada pocillo 1 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% de y 15 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivo en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 16 a 24 horas, el medio de cultivo de cada pocillo se cambió por 2 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 7,5 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar con posteriormente durante 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo. Este sobrenadante se filtró a continuación con un filtro que tenía un diámetro de 0,45 µm y la disolución resultante se utilizó como disolución de vector.

Tabla 6

		Plásmido de expresión de la proteína HN		
		pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
Plásmido de expresión de la proteína F	pCAGGS-Fct4	○	○	○
	pCAGGS-Fct14	○	○	○
	pCAGGS-Fct27	○	○	○
	PCAGGS-Fct4/SIVct11	○	○	○
	PCAGGS-Fct14/SIVct11	○	○	○
	PCAGGS-Fct27/SIVct11	○	○	○

<Transferencia génica mediada por el vector SIVagm>

Se cultivaron en placa células 293T y células BEAS-2B como diana en placas de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/pocillo, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C, la incubación se llevó a cabo durante 48 horas para las células 293T o durante 24 horas para células BEAS-2B. A continuación, se retiró el medio de cultivo de las placas de cultivo, y se superpuso sobre las células 1 ml de una mezcla obtenida mediante la adición de polibreno (Sigma) a la disolución del vector a una concentración final de 8 µg/ml. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 horas para transfectar el vector a las células; la incubación se llevó a cabo en CO<sub>2</sub> al 10% para las células 293T o en CO<sub>2</sub> al 5% para las células BEAS-2B. Después de tres horas, se añadió a las células 1 ml de medio de cultivo que contenía suero de ternera inactivado al 20% (BIO WHITTAKER), y las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas; la incubación se llevó a cabo en CO<sub>2</sub> al 10% para las células 293T o en CO<sub>2</sub> al 5% para las células BEAS-2B.

<Titulación del vector>

El título se determinó basándose en el número de células en las que se habían introducido los genes utilizando 1 ml de disolución de vector. La infección se realizó con 1 ml de la disolución de vector de acuerdo con el método descrito anteriormente. A las 48 horas de la infección, las células se fijaron con PBS (Invitrogen) que contenía formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se lavaron una vez con PBS. El valor medio para el número de células que contenían el gen transferido en un campo visual se determinó a partir de tres campos visuales diferentes bajo un microscopio de fluorescencia invertido (DMIRB (SLR), Leica) con un aumento de 200 veces, y se multiplicó por el coeficiente 854,865 que se había determinado basándose en el área del campo visual y el área de la placa para determinar el título. La unidad de título se definió como una unidad de transducción (U.T.)/ml.

<Preparación a gran escala y enriquecimiento del vector>

Las células 293T se cultivaron en placa en fuentes de plástico de 15 cm a una densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/placa, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 10 ml/fuente de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. Las células se utilizaron en la transfección. Se disolvieron 8 µg de vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF LacZ/3LTRΔU3), 2,4 µg de vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), 1,6 µg de cada plásmido de expresión de proteína HN

de virus Sendai pCAGGS-SIVct+HN y plásmido de expresión de la proteína F pCAGGS-Fct4 en 1,5 ml de Opti MEM (Gibco BRL) en cada fuente. A continuación, se añadieron a cada pocillo 40 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una disolución obtenida diluyendo 60 µl de LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 1,5 ml de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293 T preparadas anteriormente mientras que se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadieron a cada pocillo 10 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 15 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 16 a 24 horas, el medio de cultivo de cada fuente se cambió por 20 ml de DMEM que contenía albúmina sérica bovina al 1% y 7,5 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar con posterioridad durante 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo. Este sobrenadante se filtró a continuación con un filtro que tenía un diámetro de 0,45 µm. Después, el producto filtrado se centrifugó a 16.000 xg (Beckman J-25I, JA-18) a 4°C durante una hora. El sedimento se disolvió en PBS (que contenía FCS al 5% y 2 µg/ml de polibreno). La solución resultante se almacenó a -80°C.

#### 15 <Resultados>

El vector de transferencia génica (pGL3C/CMV.L.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3), el vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), el plásmido de expresión de proteína HN del virus Sendai (pCAGGS-SIVct+HN o pCAGGS-SIVct+HN), y el plásmido de expresión de la proteína F (pCAGGS-Fct4, pCAGGS-Fct14, pCAGGS-Fct27, pCAGGS-Fct4/SIVct11, pCAGGS-Fct14/SIVct11, pCAGGS-Fct27/SIVct11) se co-transfectaron en diversas combinaciones en las células. A continuación, los genes se introdujeron con éxito en células 293T y células BEAS-2B (Figs. 18, 19, y 20). La transferencia génica fue viable con los plásmidos de expresión de proteína HN y F modificados solos sin co-expresión de VSV-G. De este modo, se demostró que era posible proporcionar vectores de lentivirus pseudotipo basados en SIVagm modificados utilizando las proteínas F y HN del virus Sendai. El título del vector pseudotipo para las células 293T fue de aproximadamente  $3,6 \times 10^4$  U.T./ml. El título fue el más alto cuando se utilizaron pCAGGS-Fct4 y Fct4/SIVct11 combinados con el plásmido de expresión de la proteína F; entre las combinaciones de los dos tipos de plásmidos de expresión de la proteína F con los tres tipos de plásmidos de expresión de la proteína HN, el título más alto se logró mediante el uso combinado del plásmido de expresión de la proteína HN pCAGGS-SIVct+HN.

Se sometió a ensayo si el vector que lograba el título más elevado, que había sido preparado mediante co-transfección del plásmido de expresión de la proteína F pCAGGS-Fct4 y el plásmido de expresión de la proteína HN pCAGGS-SIVct+HN, se podría enriquecer mediante centrifugación. Como resultado, se confirmó que el vector pseudotipo F-HN se había enriquecido a un alto nivel mediante centrifugación (Fig. 21).

#### <Oligonucleótidos sometidos a ensayo>

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados, excepto SA-F1611 y SA-F1581, se sintetizaron y purificaron con cartuchos de fase inversa o PAGE en la Biochemical Research Division of the Nippon Flour Mills Co., Ltd. a través del Departamento de Síntesis de ADN Personalizado, Greiner Japón. Se sintetizaron SA-F1611 y SA-F1581 en Sawady Technology Co., y se utilizaron después de haber sido purificados mediante HPLC.

##### Xho+Xma :

5' -TCGAGATGTGGTCTGAGTTAAAAATCAGGAGCAACGACGGAGGTGAAGGACCAGACGCCAA  
CGACCC-3' (SEQ ID NO: 25)

##### Xma-Xho :

5' -CCGGGGTTCGTTGGCGTCTGGTCCCTCACCTCCGTCGTTGCTCCTGATTTTTAACTCAGAC  
CACATC-3' (SEQ ID NO: 26)

##### Xma+131 :

5' -CCGGGAAAGGGGGTGCACACATCCATATCCAGCCATCTCTACCTGTTTATGGACAGA-3  
' (SEQ ID NO: 27)

##### 135-Xma :

5' -ACCCTCTGTCCATAAACAGGTAGAGATGGCTGGATATGGATGTGTTGCACCCCCTTTCC-3  
' (SEQ ID NO: 28)

##### 132+Bam :

5' -GGGTTAGGTGGTTGCTGATTCTCTCATTACCCAGTGGG-3' (SEQ ID NO: 29)

## ES 2 430 991 T3

Bam-136:

5'-GATCCCCACTGGGTGAATGAGAGAATCAGCAACCACCTA-3' (SEQ ID NO: 30)

FSIVhn:

5'-GAGACTCGAGATGTGGTCTGAGTTAAAAATCAGG-3' (SEQ ID NO: 31)

RhnsIV:

5'-AGAGGTAGACCAGTACGAGTCACGTTTGCCCTATCACCATCCCTAACCTCTGTCCATAAAC-3' (SEQ ID NO: 32)

5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3' (SEQ ID NO: 33)

NotF1650:

5'-ATAGTTTACGCGCCGCTCATCTGATCTTCGGCTCTAATGT-3' (SEQ ID NO: 34)

NotF1611:

5'-ATAGTTTACGCGCCGCTCAACGGTCATCTGGATTACCCAT-3' (SEQ ID NO: 35)

NotF1581:

5'-ATAGTTTACGCGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3' (SEQ ID NO: 36)

SA-F1650:

5'-ATAGTTTACGCGCCGCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCTTCTGATCTTCGGCTCTAATGT-3' (SEQ ID NO: 37)

SA-F1611:

5'-ATAGTTTACGCGCCGCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCTACGGTCATCTGGATTACCCAT-3' (SEQ ID NO: 38)

SA-F1581:

5'-ATAGTTTACGCGCCGCTATGGAGATAGAGGAACATATCCCTGCCTAACCTCCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3' (SEQ ID NO: 39)

[Ejemplo 13] Preparación y análisis de funcionamiento del vector retroviral seudotipado con la envoltura del virus Sendai

<Cultivo celular>

Se cultivaron células 293T (línea celular de riñón fetal humano) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (Gibco BRL) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C.

<Preparación DE vector>

Las células 293T se cultivaron en placa en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de 5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo, y después se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 800 µl/pocillo de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. Las células se utilizaron a continuación en la transfección. En las combinaciones indicadas en la Tabla 7 de más abajo, se disolvieron 700 ng de vector de transferencia génica pMSCV EGFP, 300 ng de plásmido de expresión de la envoltura ecotrópica y gag-pol (IMGEX), 200 ng de plásmido de expresión de la proteína F del virus Sendai pCAGGS-Fct4, 200 ng de cada uno de plásmido de expresión de la proteína HN pCAGGS-HN, pCAGGS-SIVct/HN, y pCAGGS-SIVct+HN en 100 µl de Opti MEM (Gibco BRL) en cada pocillo. A continuación, se añadieron a cada pocillo 6 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una solución obtenida diluyendo 4 µl de reactivo LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 100 µl de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293 T preparadas anteriormente mientras que se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación, en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió a cada pocillo 1 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 15 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 16 a 24 horas, el medio de cultivo de cada pocillo se cambió por 2 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 7,5 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después del posterior cultivo durante

24 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió y se filtró con un filtro con poros de 0,45 µm de diámetro; la disolución resultante se utilizó como disolución de vector.

Tabla 7

		Plásmido de expresión de la proteína HN		
		pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
Plásmido de expresión de la proteína F	pCAGGS-Fct4	○	○	○

5 <Transferencia génica mediata por el vector de SIVagm>

Se cultivaron en placa células 293T como células diana en placas de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  células/pocillo, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. A continuación, el medio de cultivo se retiró de las placas de cultivo, y se superpuso sobre las células 1 ml de una mezcla obtenida mediante la adición de polibreno (Sigma) a la disolución de vector a una concentración final de 8 µg/ml. Las placas se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas para transfectar el vector a las células. Al cabo de tres horas, se añadió a las células 1 ml de un medio de cultivo que contenía suero de ternera inactivado al 20% (BIO WHITTAKER), seguido de incubación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas.

<Titulación del vector>

El título se determinó basándose en el número de células en las que se habían introducido los genes utilizando 1 ml de disolución de vector. La infección se realizó con 1 ml de la disolución del vector de acuerdo con el método descrito anteriormente. A las 48 horas de la infección, las células se fijaron con PBS (Invitrogen) que contenía formaldehído 2% y glutaraldehído al 0,2% a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se lavaron una vez con PBS. El valor medio para el número de células que contenían el gen transferido en un campo visual se determinó a partir de tres campos visuales diferentes bajo un microscopio de fluorescencia invertido (DMIRB (SLR), Leica) con un aumento de 200 veces, y se multiplicó por el coeficiente 854,865 que se había determinado basándose en el área del campo visual y el área de la placa para determinar el título. La unidad de título se definió como unidad de transducción (U.T.)/ml.

<Resultados>

El vector de transferencia génica pMSCV EGFP, el plásmido de expresión de la envoltura ecotrópica y gag-pol, el plásmido de expresión de la proteína F del virus Sendai pCAGGS-Fct4, el plásmido de expresión de la proteína HN pCAGGS-HN, pCAGGS-SIVct/HN, y pCAGGS-SIVct+HN se co-transfectaron combinados en las células. La transferencia génica a las células 293T se logró con éxito (Fig. 22). Cuando se utilizaron los plásmidos de expresión de las proteínas HN y F modificados, los genes se introdujeron con éxito en las células 293T humanas, para los cuales los virus que contenían la envoltura ecotrópica no tenían infectividad. De este modo, se demostró que era posible proporcionar un vector retroviral seudotipo basado en MSCV modificado utilizando las proteínas F y HN del virus Sendai. Adicionalmente, se utilizó pCAGGS-Fct4 como plásmido de expresión de la proteína F combinado con los tres tipos de plásmidos de expresión de la proteína HN; el título del vector retroviral seudotipo fue el más alto ( $1,1 \times 10^5$  U.T./ml), cuando éste se utilizó combinado con el plásmido de expresión de la proteína HN pCAGGS-SIVct+HN.

35 [Ejemplo 14] Producción de vector de lentivirus seudotipo VSV-G/HN y comparación con el vector lentivirus seudotipo VSV-G para determinar la eficacia de la transferencia génica a células de la médula ósea humanas, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas

<Cultivo celular >

Se cultivaron células 293T (línea celular de riñón fetal humano) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (Gibco BRL) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C.

<Titulación del vector>

El título se determinó basándose en el número de células en las que se habían introducido los genes utilizando 1 ml de la disolución de vector. La infección se realizó con 1 ml de la disolución de vector de acuerdo con el método descrito anteriormente. A las 48 horas de la infección, las células se fijaron con PBS (Invitrogen) que contenía formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se lavaron una vez con PBS. El valor medio para el número de células que contenían el gen transferido en un campo visual se determinó a partir de tres campos visuales diferentes bajo un microscopio de fluorescencia invertido (DMIRB (SLR), Leica) con un aumento de 200 veces, y se multiplicó por el coeficiente 854,865 que se había determinado basándose en el área

del campo visual y el área de la placa para determinar el título. La unidad de título se definió como unidad de transducción (U.T.)/ml.

<Preparación a gran escala y enriquecimiento del vector>

5 Las células 293T se cultivaron en placa en fuentes de plástico de 15 cm a una densidad celular de  $5 \times 10^6$  células/fuente, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 10 ml/fuente de DMEM. Las células se utilizaron en la transfección. Se disolvieron en las combinaciones indicadas en la Tabla 8 siguiente 8 µg de vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3), 2,4 µg de vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), 1,6 µg de cada plásmido de expresión de VSV-G pVSV-G y plásmido expresión de la proteína HN del virus Sendai pCAGGS-HN, pCAGGS-SIVct/HN, y pCAGGS-SIVct+HN en 1,5 ml de Opti MEM (Gibco BRL) en cada fuente. A continuación, se añadieron al pocillo 40 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una solución obtenida diluyendo 60 µl de LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 1,5 ml de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293 T preparadas anteriormente mientras se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadieron a cada pocillo 20 ml de DMEM que contenía suero de ternera inactivado al 20% (BIO WHITTAKER). Después de cultivar en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 16 a 24 horas, el medio de cultivo de cada fuente se cambió por 20 ml de DMEM que contenía suero de ternera inactivado (BIO WHITTAKER). Después cultivar posteriormente durante 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo. Este sobrenadante se filtró a continuación con un filtro que tenía un diámetro de 0,45 µm. El producto filtrado se centrifugó a 42.390 xg (TOMY SRX-201, TA21BH) a 4°C durante 90 minutos. El sedimento se disolvió en un 1/100 el volumen de la disolución de reacción de transcripción inversa (TBS, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ESPERMINA 3 mM, SUPERMIDINE 0,3 nM, de dNTP 100 mM). La disolución se incubó a 37°C durante dos horas. Después de la transcripción inversa, la reacción se centrifugó a 42.390 xg (TOMY SRX-201, TA21BH) a 4°C durante dos horas, y el sedimento se disolvió en PBS (que contenía FCS al 5% y 2 mg/ml de polibreno). La disolución resultante se almacenó a -80°C hasta su uso.

Tabla 8

	pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
pVSV-G	○	○	○

<Transferencia génica a células CD34<sup>+</sup> de médula ósea humana>

30 Se adquirieron células CD34<sup>+</sup> de médula ósea humana de BIO WHITTAKER. Después de la descongelación, las células se cultivaron en DMEM modificado de Iscove (IMDM) que contenía 50 ng/ml de IL-6, 100 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de Factor de Células Pluripotenciales (GIBCO BRL), 100 ng/ml de ligando Flt-3 (Research Diagnostics, Flanders, NJ) (todos recombinantes humanos), y FCS al 10% en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C durante 48 horas. Después de la incubación, se retiró el medio y el vector viral se añadió a  $2 \times 10^5$  células utilizando por una disolución de virus de  $2 \times 10^6$  o  $10^7$  U.T./ml. A continuación, se añadieron a las células 50 ng/ml de IL-6, 100 ng/ml de TPO, 100 ng/ml de Factor de Células Pluripotenciales (GIBCO BRL), y 100 ng/ml de ligando Flt-3. Las células se recogieron 96 horas después del inicio de la incubación.

<Análisis de citometría de flujo>

40 Las células recolectadas se tiñeron utilizando un anticuerpo anti-CD34 humano marcado con PE (Becton Dickinson), y después se analizaron utilizando dos tipos de señales de fluorescencia correspondientes a GFP y PE mediante citometría de flujo (EPICS ELITE, Coulter).

<Resultados>

45 Cuando se utilizó el vector seudotipo VSV-G a una moi = 10, la proporción de células positivas para GFP en las células CD34<sup>+</sup> fue de 9,7%; con los vectores seudotipo VSV-G y HN, SIVct/HN y SIVct+HN, la proporción de células positivas para GFP en las células CD34<sup>+</sup> fue de 43,9, 25,2 y 19,7%, respectivamente (Tabla 9). Por otra parte, utilizando el vector seudotipo VSV-G a una MOI = 50, la proporción de células positivas para GFP en las células CD34<sup>+</sup> fue de 51,4%; con los vectores seudotipo VSV-G y HN, SIVct/HN y SIVct+HN, las proporciones de células positivas para GFP en las células CD34<sup>+</sup> fueron de 43,0, 70,8, y 68,4%, respectivamente (Tabla 10).

50 Basándose en los resultados anteriores, se confirmó que el vector seudotipo preparado mediante co-expresión de la proteína VSV-G y la proteína HN garantizaba un aumento de eficacia de la transferencia génica a células de la médula ósea humana, incluyendo células pluripotenciales hematopoyéticas.

Tabla 9 Población de células positivas para GFP (%) a una m.o.i. = 10

	VSV-G	VSV-G/HN	VSV-G/SIVct/HN	VSV-G/SIVct+HN
CD34 <sup>+</sup>	9,7	43,9	25,2	19,7
CD34 <sup>-</sup>	16,7	8,0	0,3	0,2

Tabla 10 Población de células positivas para GFP (%) a una m.o.i. = 50

	VSV-G	VSV-G/HN	VSV-G/SIVct/HN	VSV-G/SIVct+HN
CD34 <sup>+</sup>	51,4	43,0	70,8	68,4
CD34 <sup>-</sup>	0,2	0,6	0,3	0,2

5 [Ejemplo 15] Construcción de plásmido de expresión para la proteína de la envoltura del virus de la influenza

Se construyó un plásmido de expresión, que codificaba la proteína hemaglutinina (HA) derivada del virus de la influenza (H1N1). Se amplificó un fragmento mediante PCR utilizando los cebadores HAFNot y HARNot y el plásmido pDREF HisD (Microbiol. Immunol., 44 (8), 677-685, 2000) como molde. El fragmento amplificado se digirió con NotI, y a continuación se insertó en el sitio NotI del vector preparado mediante la adición de un sitio XhoI-NotI a pCAGGS (Gene, vol. 108, págs. 193-200, 1991). El plásmido obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente se utilizó como plásmido de expresión de la proteína HA pCAGGS-HA.

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados se sintetizaron y purificaron con cartuchos de fase inversa o PAGE en la Biochemical Research Division of the Nippon Flour Mills Co., Ltd. a través del Departamento de Síntesis de ADN personalizado, Greiner Japón.

HAFNot: 5'-GAGAGCGGCCGCCCAAATGAAGGCAAACTACTG-3' (SEQ ID NO:

48)

HARNot: 5'-GATGCGGCCGCTCAGATGCATATTCTGCAC-3' (SEQ ID NO: 49)

[Ejemplo 16] Preparación y análisis del funcionamiento del vector lentivirus pseudotipo de la envoltura del virus de la influenza

<Cultivo celular>

20 Se cultivaron células 293T (línea celular de riñón fetal humano) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (Gibco BRL) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C.

<Preparación de vector>

25 Las células 293T se cultivaron en placa en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de 5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo, y después se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 800 µl/pocillo de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. A continuación las células se utilizaron en la transfección. Se disolvieron 1200 ng de vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3), 360 ng de vector empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), y 240 ng de plásmido de expresión de la proteína HA pCAGGS-HA en 100 µl de Opti MEM (Gibco BRL) en cada pocillo. A continuación, se añadieron al pocillo 6 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una disolución obtenida diluyendo de 4 µl de reactivo LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 100 µl de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293 T preparadas anteriormente mientras se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió a cada pocillo 1 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 10 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 16 a 24 horas, el medio de cultivo en cada pocillo se cambió por 2 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%, 5 µg/ml de tripsina (Gibco BRL), y 50 unidades de neuraminidasa (Roche). Después cultivar posteriormente durante 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo. Este sobrenadante se filtró a continuación con un filtro que tenía un diámetro de 0,45 µm y la disolución resultante se utilizó como disolución de vector.

<Transferencia génica mediada por el vector de SIVagm>

Se cultivaron en placa células 293T como células diana en placas de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de 1 x 10<sup>6</sup> células/pocillo, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. A continuación, el medio de cultivo se retiró de las placas de cultivo, y se superpuso sobre las células 1 ml de una mezcla obtenida mediante

la adición de polibreno (Sigma) a la disolución del vector en una concentración final de 8 µg/ml. Las placas se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas para transfectar el vector a las células. Después de tres horas, se añadió a las células 1 ml de un medio de cultivo que contenía suero de ternera inactivado al 20% (BIO WHITTAKER), y las células se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas.

#### 5 <Titulación del Vector>

El título se determinó basándose en el número de células en las que se habían introducido los genes utilizando 1 ml de disolución de vector. La infección se realizó con 1 ml de la solución de vector de acuerdo con el método descrito anteriormente. A las 48 horas de la infección, las células se fijaron con PBS (Invitrogen) que contenía formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% a temperatura ambiente durante 20 minutos, y se lavaron una vez con PBS. El valor medio del número de células que contenían el gen transferido en un campo visual se determinó a partir de tres campos visuales diferentes bajo un microscopio de fluorescencia invertido (DMIRB (SLR), Leica) con un aumento de 200 veces, y se multiplicó por el coeficiente 854,865 que se había determinado basándose en el área del campo visual y el área de la placa para determinar el título. La unidad de título se definió como unidad de transducción (U.T./ml).

#### 15 <Preparación a gran escala y enriquecimiento del vector>

Las células 293T se cultivaron en placa en fuentes de plástico de 15 cm a una densidad celular de 5 x 10<sup>6</sup> células/fuente, y se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 10 ml/fuente de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. Las células se utilizaron en la transfección. Se disolvieron 8 µg del vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF LacZ/3LTRΔU3), 2,4 µg de vector empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), y 1,6 µg de plásmido de expresión de la proteína HA pCAGGS-HA en 1,5 ml de Opti MEM (Gibco BRL) en cada fuente. A continuación, se añadieron al pocillo 40 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una disolución obtenida diluyendo de 60 µl de LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 1,5 ml de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293 T preparadas anteriormente mientras se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió a cada fuente 10 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 10 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 16 a 24 horas, el medio de cultivo de cada fuente se cambió por 20 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%, 5 µg/ml de tripsina (Gibco BRL), y 500 unidades de neuraminidasa (Roche). Después cultivar posteriormente durante 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo y se filtró con un filtro que tenía poros con un diámetro de 0,45 µm. El producto filtrado se centrifugó a 16000x g (Beckman J-25I, JA-18) a 4°C durante una hora. El sedimento se disolvió en PBS (que contenía FCS al 5% y 2 µg/ml de polibreno). La disolución resultante se almacenó a -80°C.

#### <Resultados>

35 El vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3), el vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), y el plásmido de expresión de la proteína HA (pCAGGS-HA) se co-transfectaron en diferentes combinaciones a las células. A continuación, los genes se introdujeron con éxito en las células 293T (Fig. 23). La transferencia génica fue fiable sin co-expresión de VSV-G. De este modo, se demostró que era posible proporcionar un vector de lentivirus seudotipo basado en SIVagm utilizando la proteína HA del virus de la influenza. El título del vector seudotipo para las células 293T fue de 1,3x 10<sup>4</sup> U.T./ml. Adicionalmente, se sometió a ensayo si el vector preparado mediante el procedimiento descrito anteriormente podría enriquecerse mediante centrifugación. Como resultado, se confirmó que el vector seudotipo HA se había enriquecido a un alto nivel mediante centrifugación (Fig. 24).

45 [Ejemplo 17] Preparación y análisis de funcionamiento del vector de lentivirus seudotipado con la envoltura del virus de la influenza and el virus Sendai

#### <Cultivo celular>

Se cultivaron células 293T (línea celular de riñón fetal humano) en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con alto contenido de glucosa (Gibco BRL) que contenía suero de ternera inactivado al 10% (BIO WHITTAKER) en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C.

#### 50 <Preparación de vector>

Las células 293T se cultivaron en placa en una placa de cultivo de plástico de 6 pocillos a una densidad celular de 5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo, y después se incubaron en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 48 horas. El medio de cultivo se cambió por 800 µl/pocillo de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%. A continuación las células se utilizaron en la transfección. En las combinaciones indicadas en la Tabla 11 de más abajo, se disolvieron 1200 ng de vector de transferencia génica (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3), 360 ng de vector empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), y 240 ng de cada plásmido de expresión de la proteína HN del virus Sendai pCAGGS-HN, pCAGGS-SIVct/HN, pCAGGS-SIVct+HN y plásmido de expresión del a proteína HA en 100 µl de Opti



MEM (Gibco BRL) en cada pocillo. A continuación, se añadieron al pocillo 6 µl de reactivo PLUS (Gibco BRL). La mezcla se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió a la mezcla una disolución obtenida diluyendo de 4 µl de reactivo LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) con 100 µl de Opti MEM. La mezcla disolvente se agitó, y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante otros 15 minutos. La mezcla resultante se añadió gota a gota a las células 293 T preparadas anteriormente mientras se agitaba suavemente. Las células se incubaron a continuación en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 3 horas. Se añadió a cada pocillo 1 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1% y 10 µg/ml de tripsina (Gibco BRL). Después de cultivar en CO<sub>2</sub> al 10% a 37°C durante 16 a 24 horas, el medio de cultivo de cada pocillo se cambió por 2 ml de DMEM que contenía albúmina de suero bovino al 1%, 5 µg/ml de tripsina (Gibco BRL), y 50 unidades de neuraminidasa (Roche). Después cultivar posteriormente durante 24 horas, se recogió el sobrenadante del cultivo y se filtró con un filtro que tenía poros con un diámetro de 0,45 µm; la disolución resultante se utilizó como disolución de vector.

Tabla 11

		Plásmido de expresión de la proteína HN		
		pCAGGS-HN	pCAGGS-SIVct/HN	pCAGGS-SIVct+HN
Plásmido de expresión de la proteína HA	pCAGGS-HA	○	○	○

<Resultados>

El vector de transferencia génica (pGL3C/CMV.L.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3), el vector de empaquetamiento (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), el plásmido de expresión de la proteína HA (pCAGGS-HA), y el plásmido de expresión de la proteína HN del virus Sendai (pCAGGS-HN, pCAGGS-SIVct/HN, pCAGGS-SIVct+HN) se co-transfectaron en diferentes combinaciones a las células. A continuación, los genes se introdujeron con éxito en las células 293T (Fig. 25). La neuraminidasa es responsable de la escisión de la unión con el ácido siálico en la gemación del virus de la influenza, y por lo tanto fue necesaria para la preparación del seudotipo HA. De este modo, se sometieron a ensayo los diferentes plásmidos de expresión de HN para determinar la actividad neuraminidasa de la proteína HN del virus Sendai; la coexistencia de la proteína HN condujo a la producción del vector deseado. El resultado demostró que era posible proporcionar un vector de lentivirus seudotipo HA/HN novedoso.

**Aplicabilidad industrial**

La presente invención proporciona vectores retrovirales seudotipados con proteínas de membrana que tienen actividad hemaglutinina. Los vectores de la presente invención se pueden utilizar preferiblemente para la terapia génica, etc. En particular, los vectores son útiles para la administración *in vivo* a las vías respiratorias y para la administración *ex vivo* a células pluripotenciales hematopoyéticas diana.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DNAVEC Research INC.

<120> Vectores retrovirales seudotipo con proteínas hemaglutinantes

<130> D3-107PCT

5 <140>  
<141>

<150> JP 2000-169090

<151> 01-06-2000

<160> 49

10 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente

<400> 1

gcagatctca accaggaggc gaggctgcat ttggg 36

20 <210> 2

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente

25 <400> 2

gcgaattcta ctactgggtg ctgtaaagga gccaaa 36

<210> 3

<211> 40

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente

<400> 3

atcggaattc ttttattgta agatggattg gttttaaat 40

35 <210> 4

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente

<400> 4

cgggatccgc ggccgcgat atggatctgt ggagatagag gaacatat 48

<210> 5

<211> 29

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

# ES 2 430 991 T3

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 5  
tcgagactag tgacttggtg agtaggctt 29

5 <210> 6  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 6  
tcgaaagcct actcaccaag tcactactc 29

15 <210> 7  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 7

20 aatttctcga gcggcgcga 19  
<210> 8  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 8  
aatttcgagc gcgctcgaga 19

30 <210> 9  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 9

35 gcggtactcg gatgggattt attactccga tagga 35  
<210> 10  
<211> 40  
<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 10  
gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctatttctgc 40

45 <210> 11  
<211> 36  
<212> ADN

# ES 2 430 991 T3

<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 11

5 gcgaattccc gtttgctga gggctcttag gcttct 36  
<210> 12  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 12  
tccccgcca tatgatctg tggagataga ggaacatc 40  
<210> 13  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente

20 <400> 13  
gcgcggccgc ggatccgtcg acgcactttt taaaagaaaa ggga 44  
<210> 14  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 14  
gcgagctcta atgcaggcaa gtttattagc ttcta 36  
<210> 15  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 15  
ggaattcccg cggtagttat taatagtaat caattacggg 40  
<210> 16  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 16  
cgggatccgc ggccgcttac ttgtacagct cgtccatgcc 40  
<210> 17

# ES 2 430 991 T3

<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 17  
tatataagca gagctcgctg gcttgtaact cagtctctta 40

<210> 18  
<211> 40  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 18  
15 tatataagtg cagtacgctg gcttgtaact cagtctctta 40

<210> 19  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 19  
tataaaaagc gaagccgctg gcttgtaact cagtctctta 40

<210> 20  
<211> 40  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 20  
30 gcgaattcga tagggcttga aacatgggta ctattctgc 40

<210> 21  
<211> 40  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 21  
cggggtacct caatattggc cattagccat attattcatt 40

<210> 22  
<211> 40  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente  
<400> 22  
agttacaagc cagcgagctc tgcttatata gacctccac 40

ES 2 430 991 T3

<210> 23  
 <211> 99  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente

<400> 23

atgcgagctc gtcgacgcac tttttaaag aaaaggagg actggatggg atttattact 60

ccgataggac gctggcttgt aactcagtct ctactagg 99

10 <210> 24  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia ADN sintetizada artificialmente

15 <400> 24

gcgagctcta atcgagcaa gtttattagc ttcta 36

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

20 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 25

tcgagatgtg gtctgagta aaaatcagga gcaacgacgg aggtgaagga ccagacgcca 60

acgaccc 67

25 <210> 26  
 <211> 67  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

30 <400> 26

ccgggggtcg ttggcgtctg gtccttcacc tccgtcgttg ctctgattt ttaactcaga 60

ccacatc 67

<210> 27  
 <211> 59  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 27

40 ccggggaaag ggggtgcaac acatccatat ccagccatct ctacctgttt atggacaga 59

<210> 28  
 <211> 59  
 <212> ADN

# ES 2 430 991 T3

<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
<400> 28

5 accctctgtc cataaacagg tagagatggc tggatatgga tegtgtgcac cccctttcc 59  
<210> 29  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
<400> 29  
gggtaggtg gttgctgatt ctctcattca cccagtggg 39  
<210> 30  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

20 <400> 30  
gatccccact gggatgatga gagaatcagc aaccaccta 39  
<210> 31  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
<400> 31  
gagactcgag atgtgtctg agttaaaaat cagg 34  
<210> 32  
<211> 63  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
<400> 32  
agaggtagac cagtacgagt cacgtttgcc cctatcacca tcctaacc tctgtccata 60  
aac 63  
<210> 33  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
<400> 33

45 ccgctcgagc atgacagcat atatccagag a 31

ES 2 430 991 T3

<210> 34  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
  
<400> 34  
atagtttagc ggccgctcat ctgatctcg gctctaatgt 40

10 <210> 35  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

15 <400> 35  
atagtttagc ggccgctcaa cggatcatctg gattacccat 40

<210> 36  
<211> 40  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
  
<400> 36  
atagtttagc ggccgctcac ctctgagtc tataaagcac 40

25 <210> 37  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
  
<400> 37  
atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc cttctgatct 60  
tcggctctaa tgt 73

<210> 38  
<211> 73  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
  
<400> 38  
atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc ctacggtcat 60

40 ctggattacc cat 73  
  
<210> 39  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial



ES 2 430 991 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 39

atagtttagc ggccgcctat ggagatagag gaacatatcc ctgcctaacc ctccttctga 60  
gtctataaag cac 73

5

<210> 40

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 40

Trp Ser Glu Leu Lys Ile Arg Ser Asn Asp Gly Gly Glu Gly Pro Glu  
1 5 10 15

Asp Ala Asn Asp Pro Arg Gly Lys Gly Val Gln His Ile His Ile Gln  
20 25 30

Pro Ser Leu Pro Val Tyr Gly Gln Arg Val Arg Val Arg Trp Leu Leu  
35 40 45

Ile Leu Ser Phe Thr Gln

50

<210> 41

<211> 54

15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 41

ES 2 430 991 T3

Trp Ser Glu Leu Lys Ile Arg Ser Asn Asp Gly Gly Glu Gly Pro Glu  
1 5 10 15

Asp Ala Asn Asp Pro Arg Gly Lys Gly Val Gln His Ile His Ile Gln  
20 25 30

Pro Ser Leu Pro Val Tyr Gly Gln Arg Val Arg Val Arg Asp Gly Asp  
35 40 45

Arg Gly Lys Arg Asp Ser

50

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 42

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg

1 5 10 15

10 <210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 43

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser

1 5 10 15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg

20

25

<210> 44

<211> 38

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 44

ES 2 430 991 T3

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser  
1 5 10 15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr  
20 25 30

Leu Glu Pro Lys Ile Arg  
35

<210> 45  
<211> 26  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
<400> 45

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Arg  
1 5 10 15

Val Arg Gln Gly Tyr Val Pro Leu Ser Pro  
20 25

10 <210> 46  
<211> 36  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente  
<400> 46

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser  
1 5 10 15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Arg Val Arg Gln Gly Tyr Val  
20 25 30

Pro Leu Ser Pro  
35

20 <210> 47  
<211> 49  
<212> PRT

ES 2 430 991 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 47

Val Val Ile Ile Val Ile Ile Ile Val Leu Tyr Arg Leu Arg Arg Ser  
1 5 10 15

Met Leu Met Gly Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr  
20 25 30

Leu Glu Pro Lys Ile Arg Arg Val Arg Gln Gly Tyr Val Pro Leu Ser  
35 40 45

5 Pro

<210> 48

<211> 35

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 48

gagagcggcc gcccaaatg aaggcaaac tactg 35

<210> 49

15 <211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintetizada artificialmente

20 <400> 49

gatcggcgcg ctcatgca tattctcac 30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para producir un vector retroviral seudotipo, comprendiendo el método la etapa de transcribir un ADN vector de transferencia génica derivado de retrovirus a una célula de empaquetamiento que comprende ADN que codifica las proteínas HN y F del virus Sendai de una manera expresable, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico para producir un vector retroviral seudotipo que tiene dichas proteínas HN y F.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado mediante la adición de o el remplazo por un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura retroviral.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula de empaquetamiento comprende adicionalmente ADN que codifica la proteína HA de ortomixovirus.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula de empaquetamiento comprende adicionalmente ADN que codifica una proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas es
  - (a) una proteína de la envoltura anfotrópica derivada de un retrovirus; o
  - (b) la proteína VSV-G derivada de un virus de la estomatitis vesicular.
- 20 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector retroviral deriva de
  - (a) oncovirus; o
  - (b) lentivirus.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el lentivirus deriva del virus de la inmunodeficiencia de simios.
- 25 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína HN del virus Sendai ha sido modificada para que comprenda la secuencia del SEQ ID NO: 40 o 41.
- 30 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína F comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 42.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína F ha sido modificada adicionalmente para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
- 35 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la proteína F del virus Sendai comprende la secuencia del SEQ ID NO: 45.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el vector comprende un gen foráneo de una manera expresable.
- 40 15. Un vector retroviral seudotipo que tiene las proteínas HN y F del virus Sendai, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
16. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
- 45 17. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado mediante la adición de o el remplazo por un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura retroviral.
18. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, comprende adicionalmente la proteína HA de ortomixovirus.

19. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, comprende adicionalmente una proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas.
20. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la proteína de la envoltura derivada de un virus que es infeccioso para células humanas es
- 5 (a) una proteína de la envoltura anfotrópica derivada de un retrovirus; o
- (b) la proteína VSV-G derivada de un virus de la estomatitis vesicular.
21. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el vector retroviral deriva de
- (a) oncovirus; o
- (b) lentivirus.
- 10 22. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el lentivirus deriva del virus de la inmunodeficiencia de simios.
23. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN del virus Sendai ha sido modificado para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
- 15 24. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la proteína HN del virus Sendai ha sido modificada para que comprenda la secuencia del SEQ ID NO: 40 o 41.
25. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la proteína F comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 42.
- 20 26. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la proteína F ha sido modificada adicionalmente para que comprenda un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura del virus de la inmunodeficiencia de simios.
27. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la proteína F del virus Sendai comprende la secuencia del SEQ ID NO: 45.
- 25 28. El vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 27, en donde el vector comprende un gen foráneo de una manera expresable.
29. El uso del vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28, para la preparación de una composición farmacéutica para transferir un gen foráneo a una célula en terapia génica.
30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la célula es una célula que tiene moco.
- 30 31. El uso de acuerdo con la reivindicación 30, en donde la célula que tiene moco es una célula epitelial de la mucosa.
32. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, en donde la célula epitelial de la mucosa es una célula epitelial de la mucosa de la cavidad nasal o del tubo bronquial pulmonar.
33. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la célula es un hemocito o una célula hematopoyética.
- 35 34. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en donde el hemocito o la célula hematopoyética es una célula pluripotencial hematopoyética.
35. Una composición para la transferencia génica, comprendiendo la composición el vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28 para la transferencia génica.
36. La composición de acuerdo con la reivindicación 35, en donde la composición es una composición farmacéutica.
- 40 37. Un método in vitro para introducir un gen foráneo en células, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto las células con el vector retroviral seudotipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 28.
38. Una célula de empaquetamiento para producir el vector retroviral seudotipo, comprendiendo la célula, de una manera expresable, ADN que codifica las proteínas HN y F del virus Sendai, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar de 0 a 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.
- 45 39. La célula de empaquetamiento de acuerdo con la reivindicación 38, en donde una porción de un dominio citoplásmico de la proteína F ha sido suprimida para conservar 4 aminoácidos del dominio citoplásmico.

40. La célula de empaquetamiento de acuerdo con la reivindicación 38, en donde el dominio citoplásmico de la proteína HN ha sido modificado mediante la adición de o el remplazo por un dominio citoplásmico de una proteína de la envoltura retroviral.

Figura 1

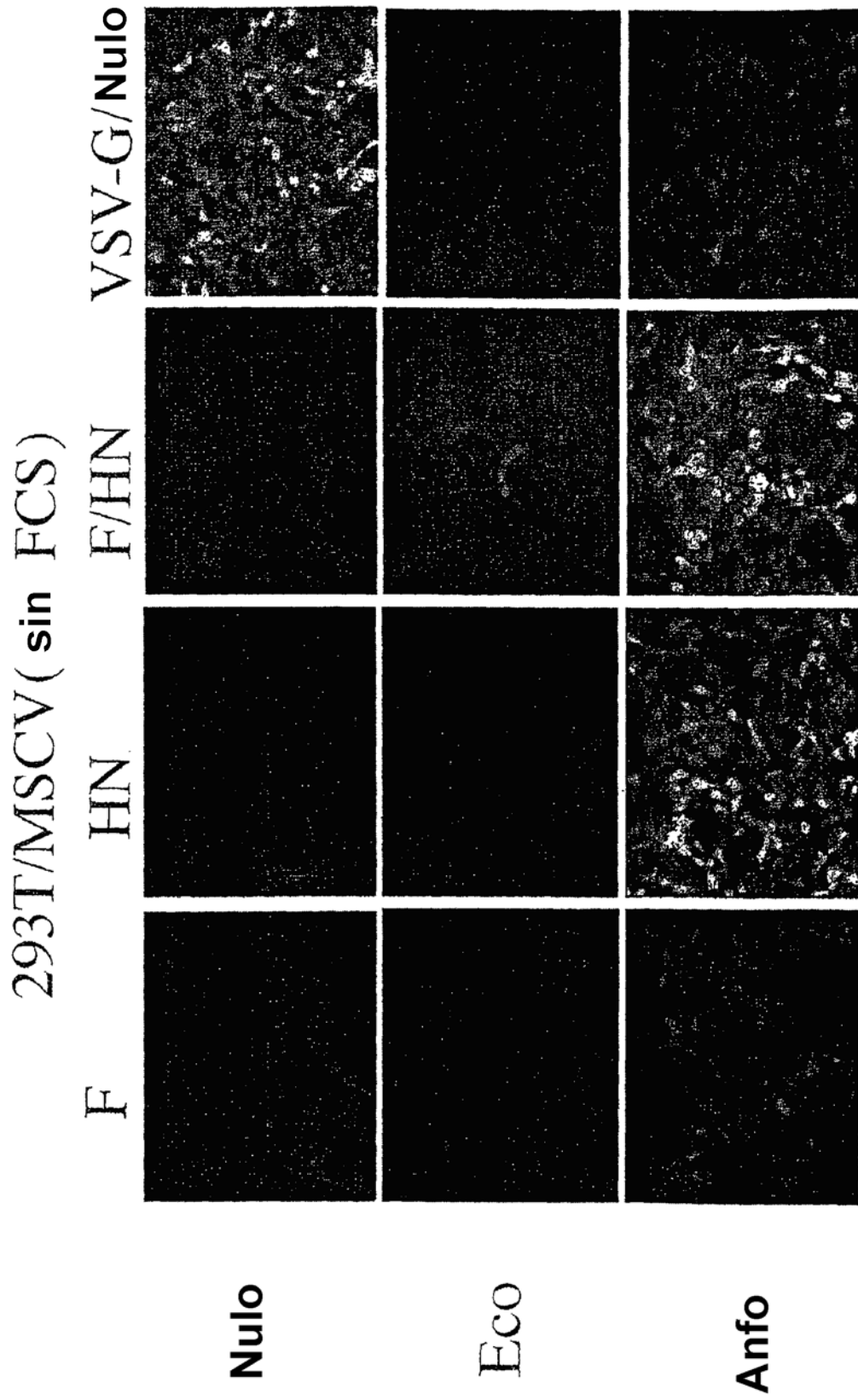




Figura 2

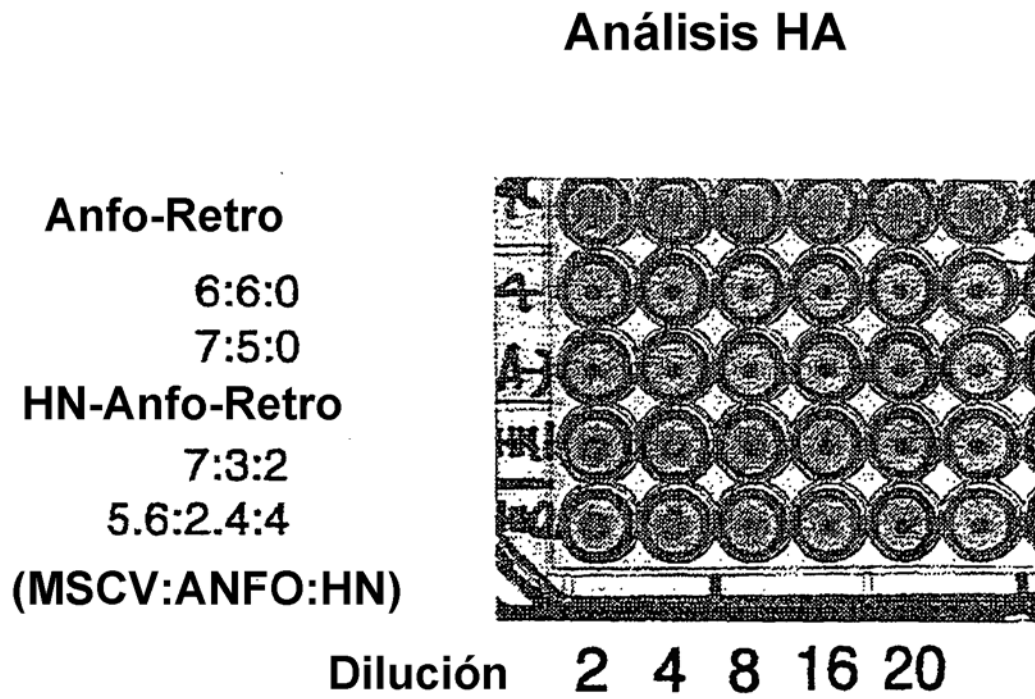


Figura 3

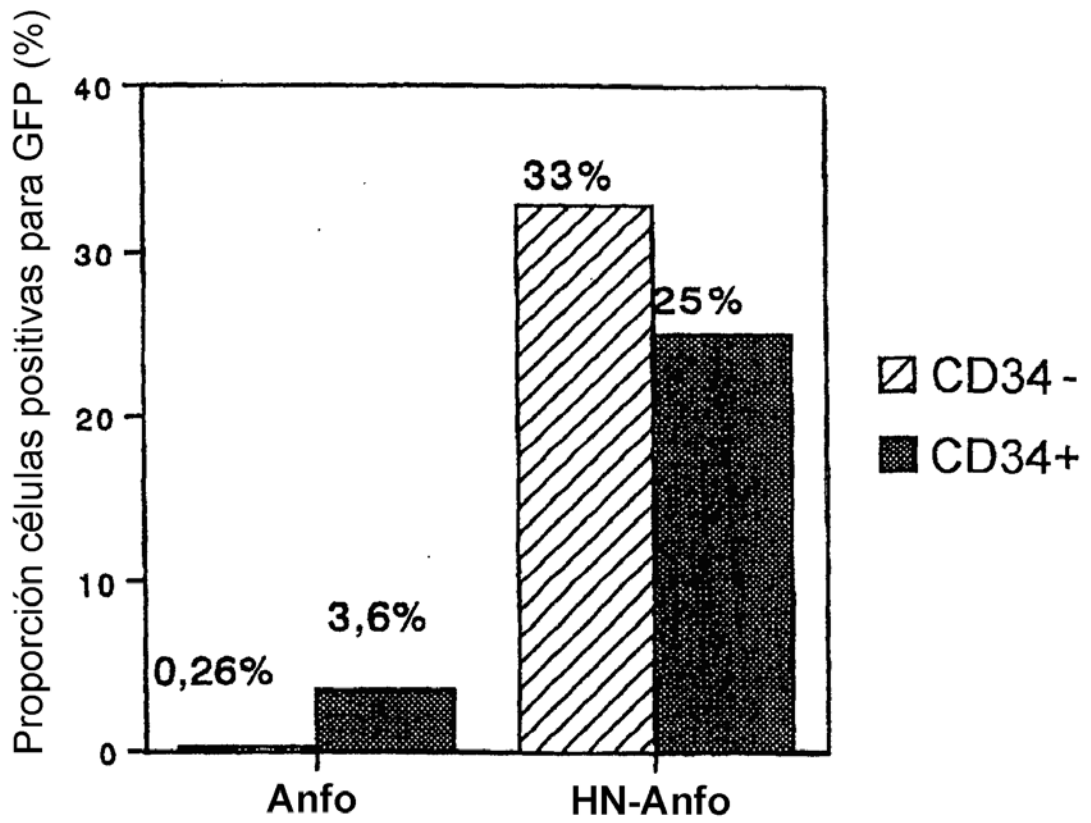
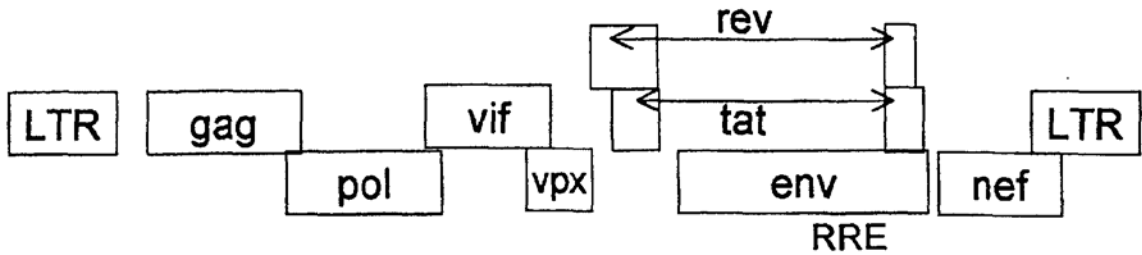
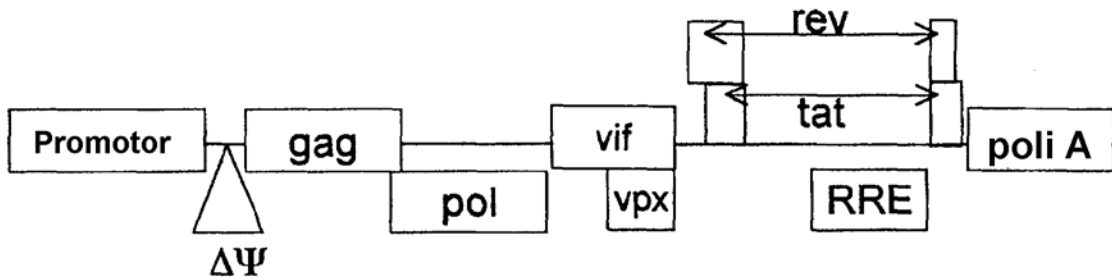


Figura 4

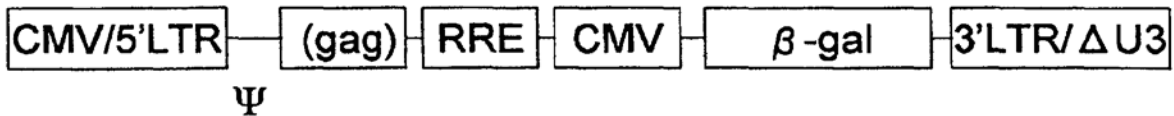
a. Genoma SIVagm    Genoma provirus SIVagm    pSA212



b. Vector empaquetamiento    Vector Empaquetamiento  
pCAG / SIVagm gag-tat / rev



c. Vector transferencia génica    Vector Transferencia Génica  
pGL3C / CMV. U3G2 / RREc/s / CMVF  $\beta$ -gal / 3'LTR  $\Delta$ U3



d. Vector suministro VSV-G    pVSV-G

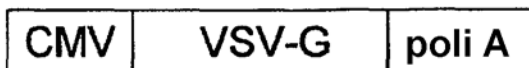


Figura 5

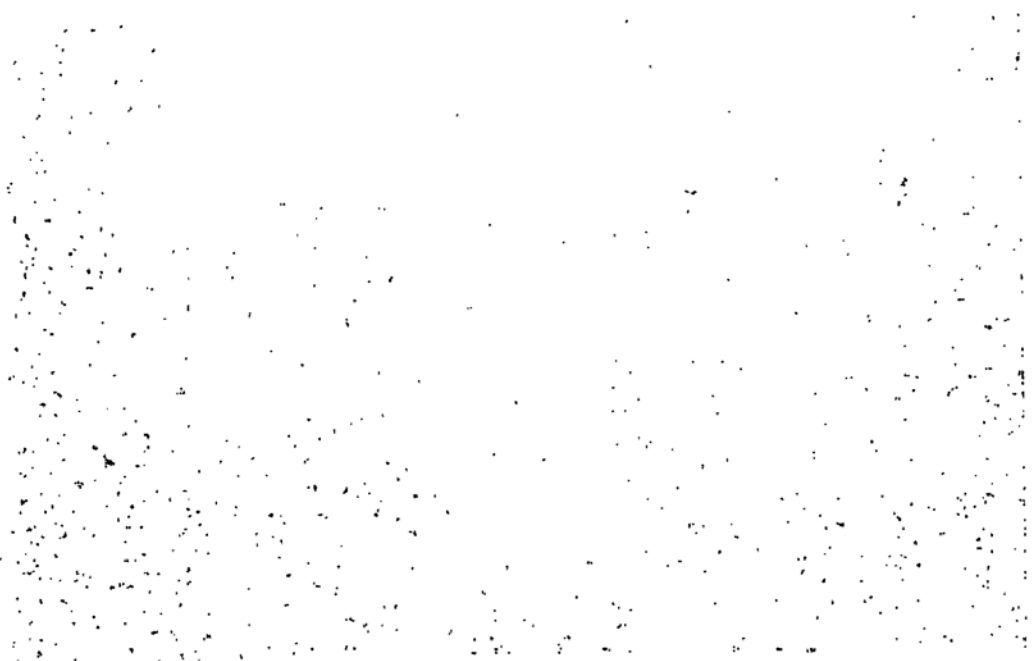
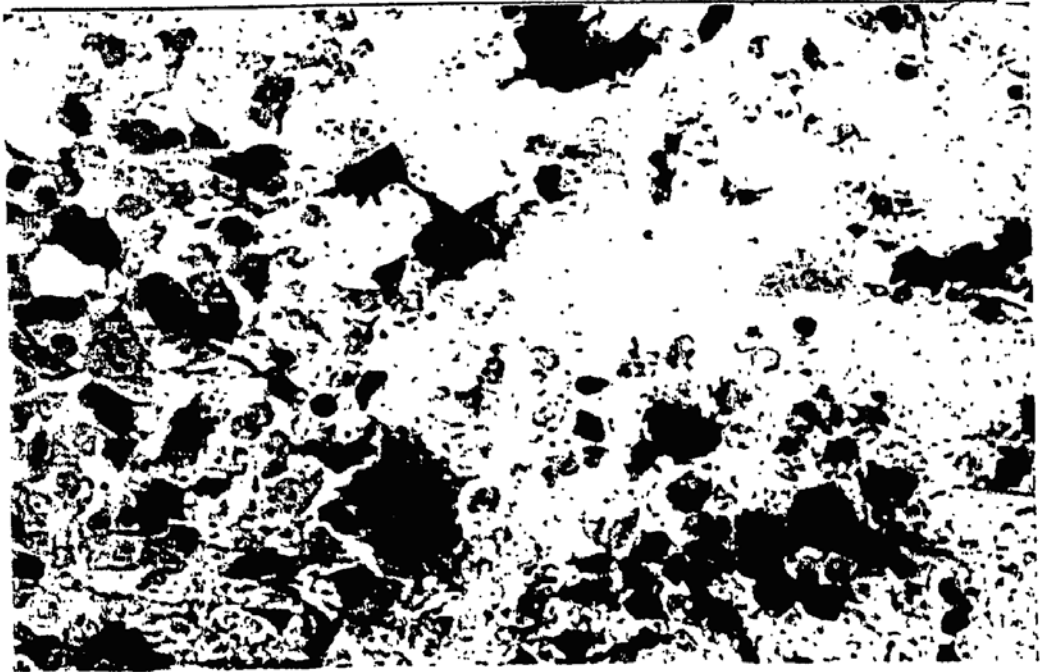


Figura 6

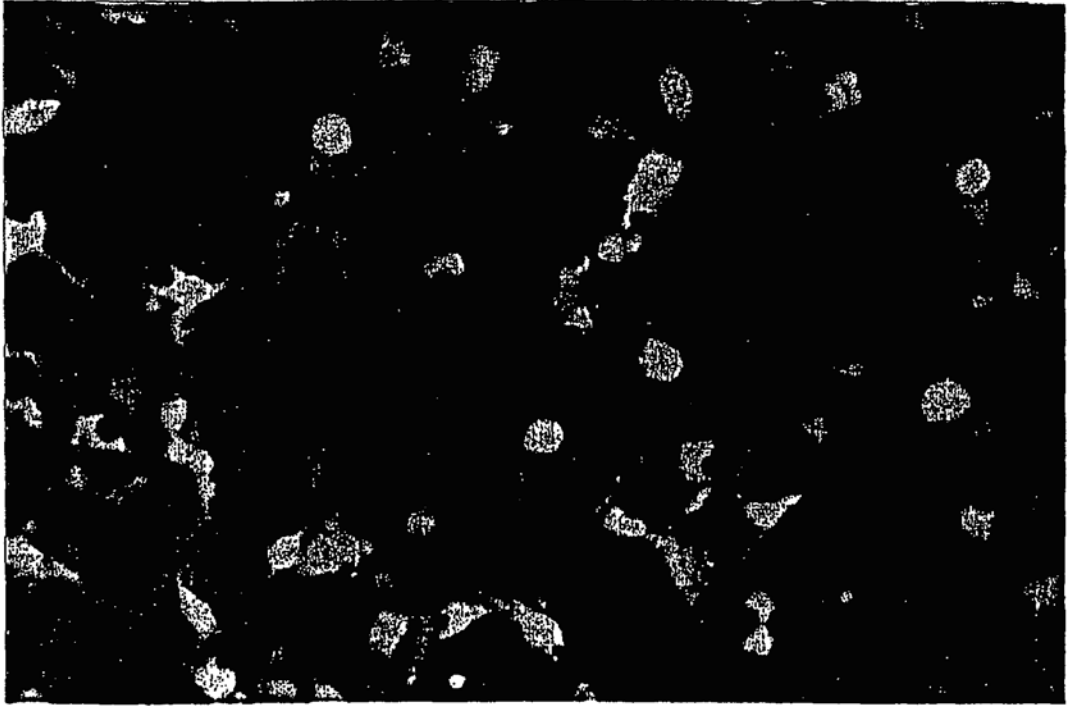


Figura 7

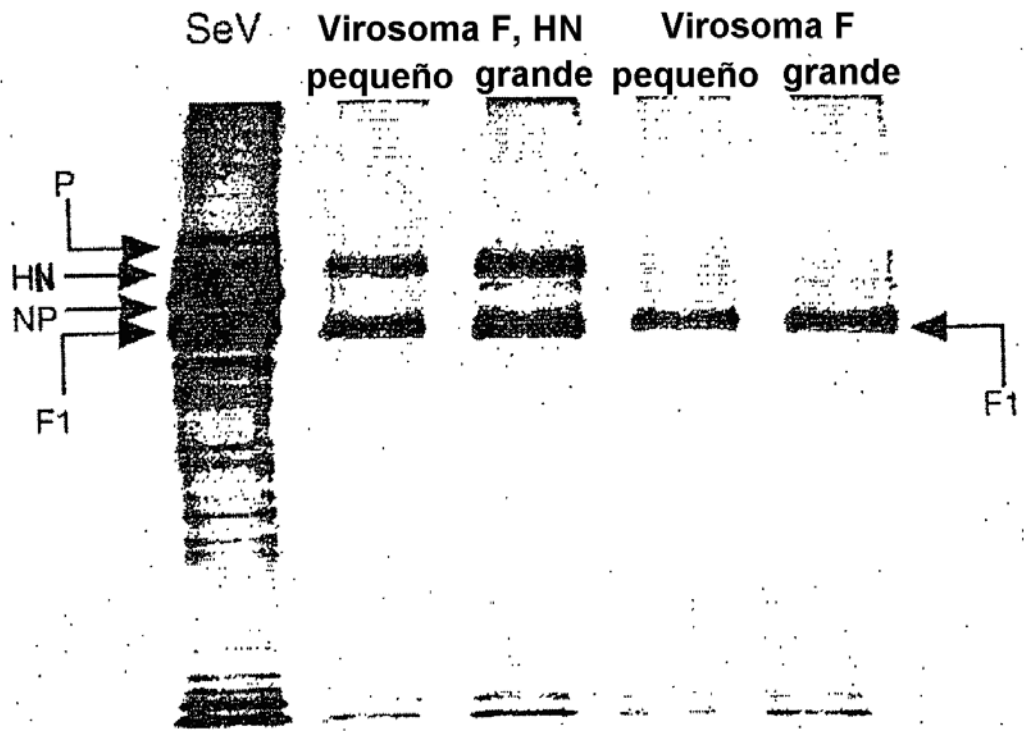


Figura 8

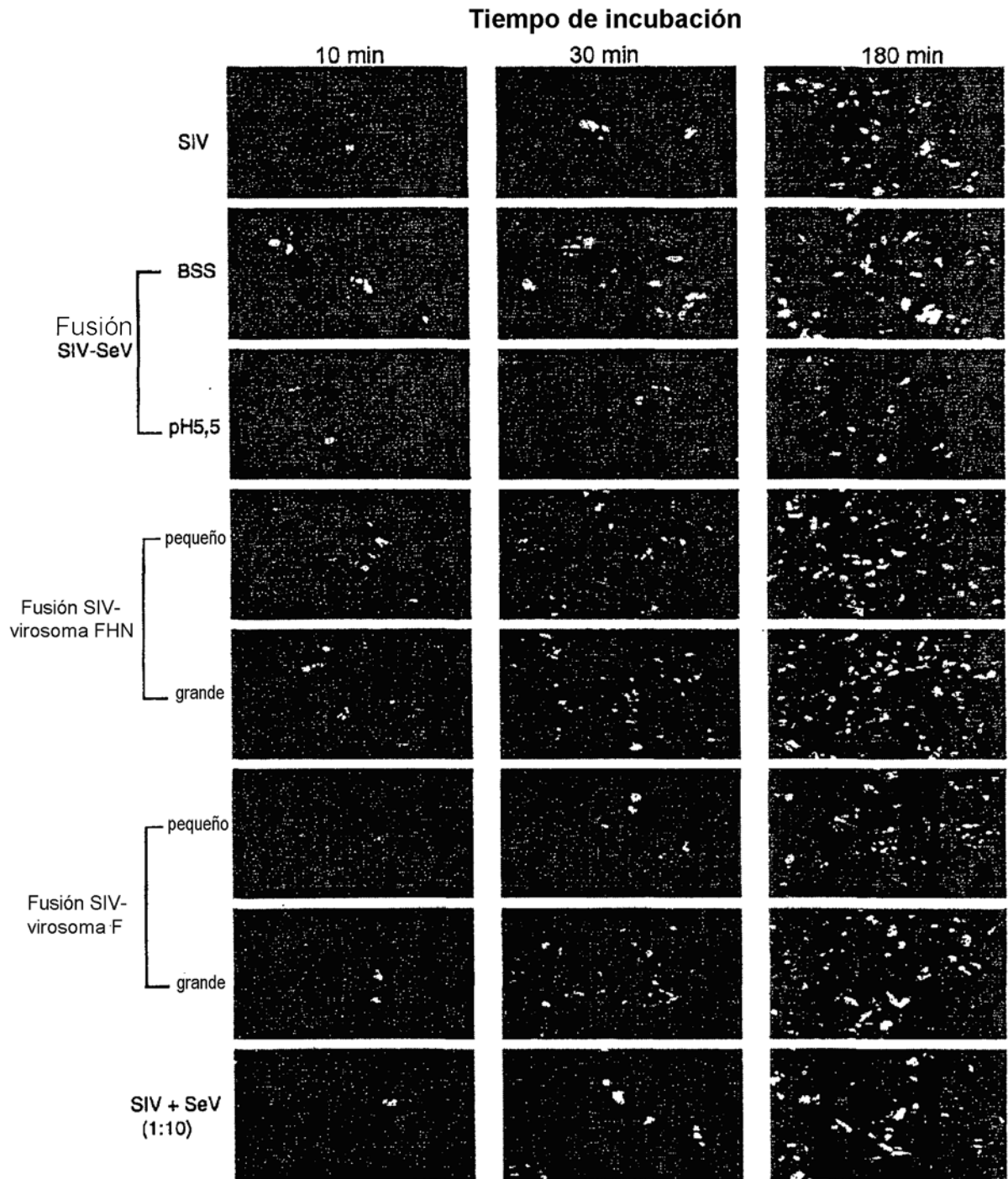


Figura 9

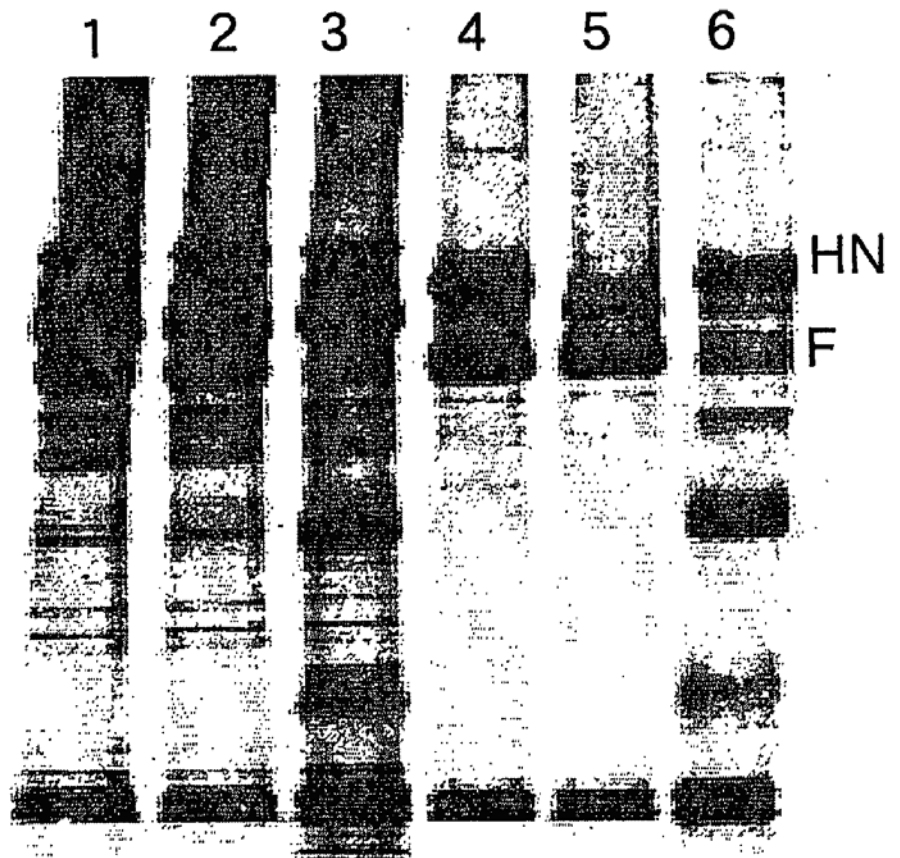




Figura 10

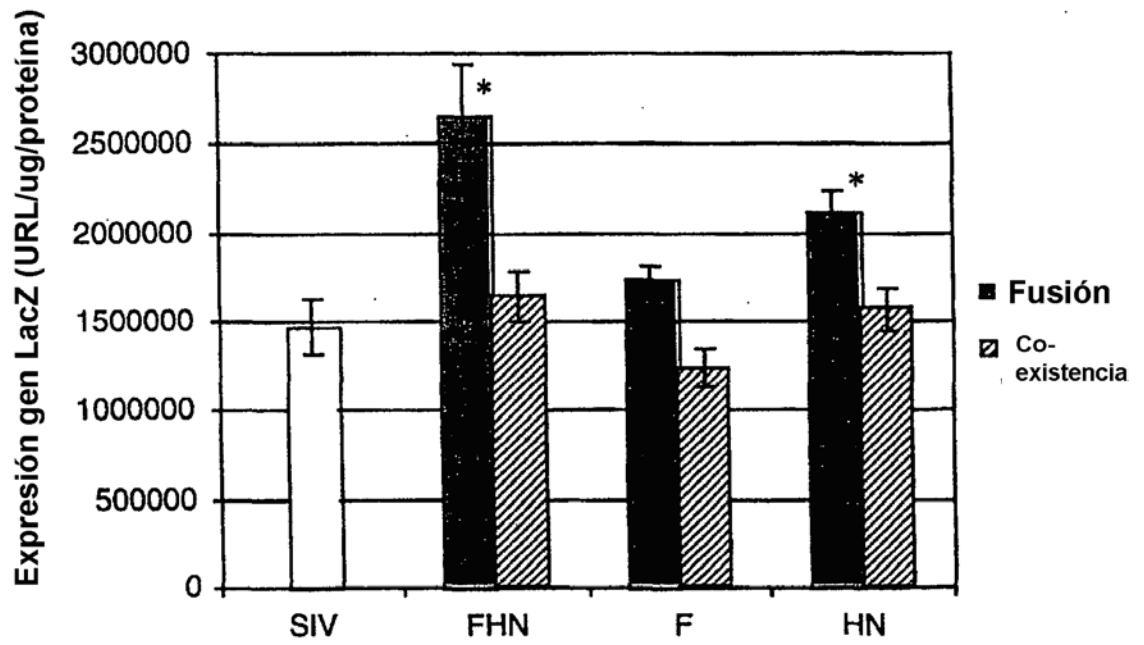


Figura 11

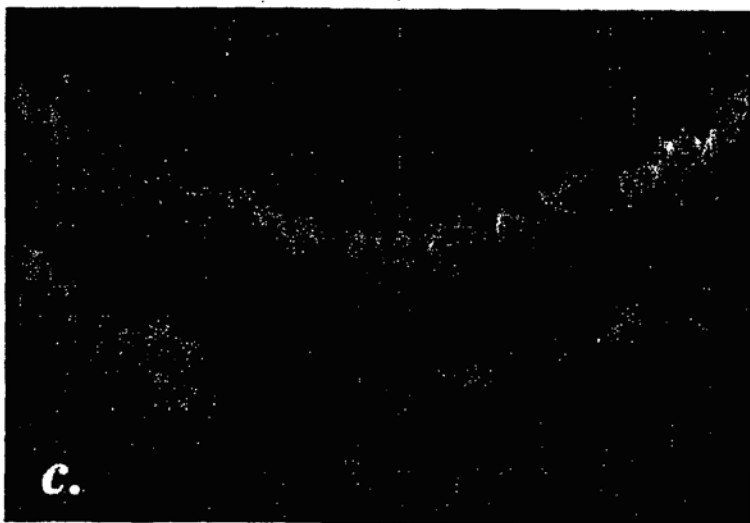
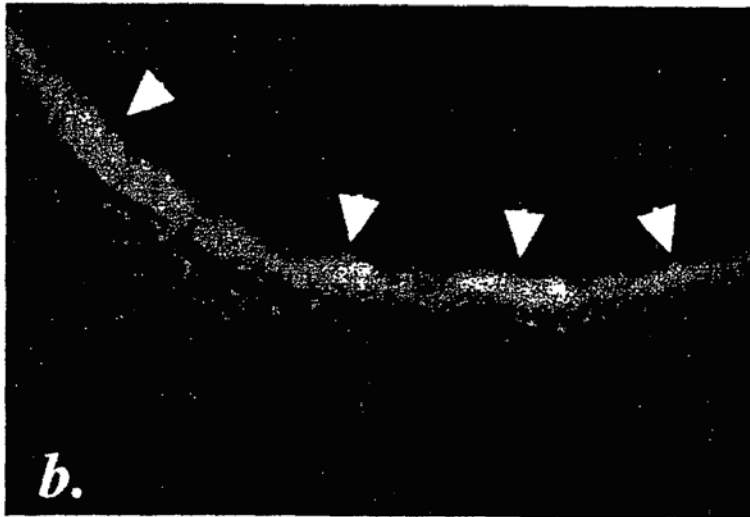
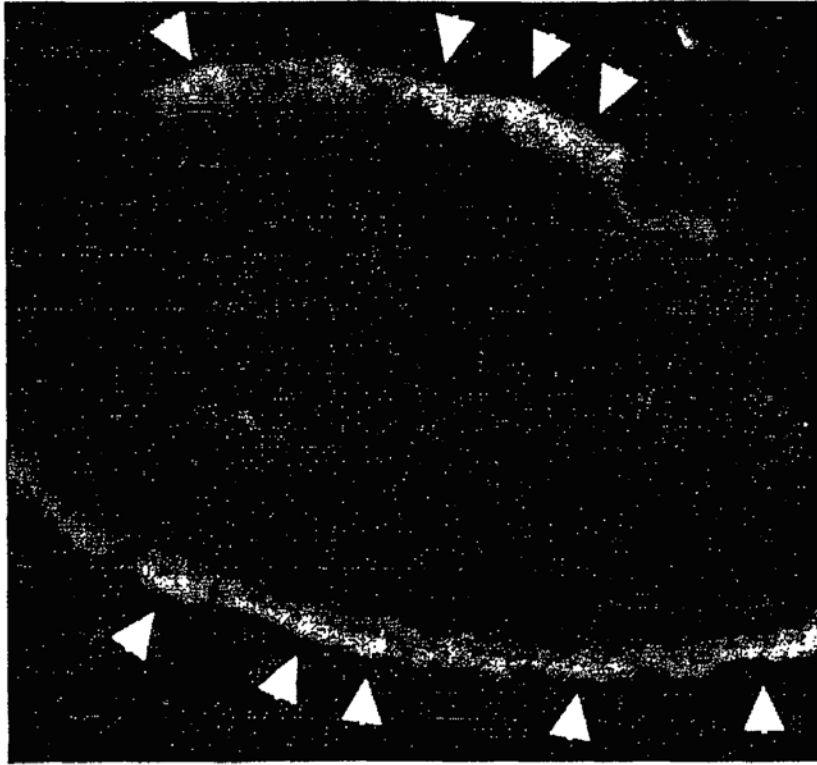
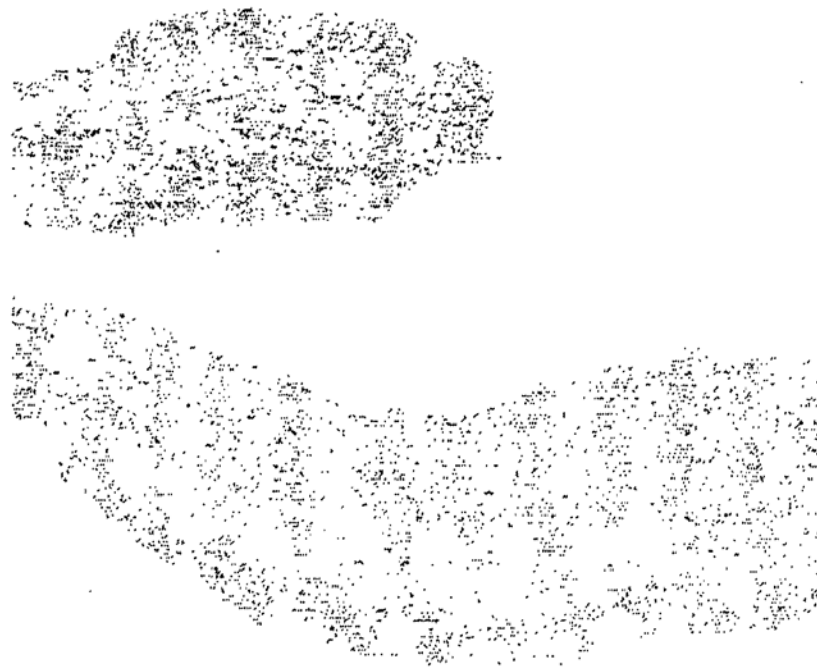


Figura 12



**b. Expresión GFP**  
**SIV-F/HN/M - EGFP 10<sup>8</sup> pfu**  
**(sección seriada de a.)**



**a. Membrana mucosa septonasal ratón**  
**(tinción H.E.)**

Figura 13

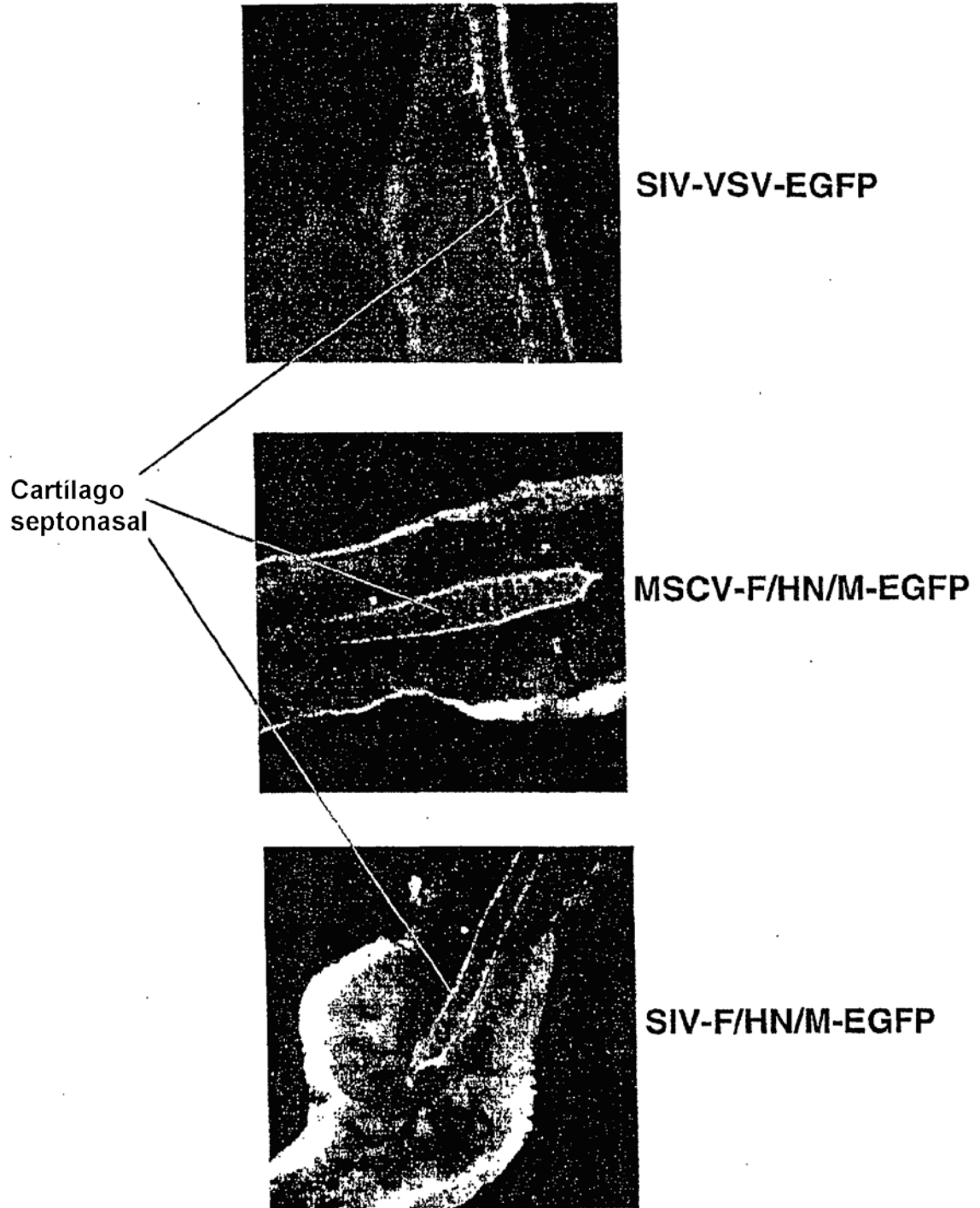


Figura 14

SIVct/HN WSELKIRSNDGGEGPEDANDPRGKGVQHIHIQPSLPVYGQVRVR WLLILSFTQ

XXX: Dominio citoplásmico SIV

XXX: Dominio transmembrana proteína HN

Figura 15

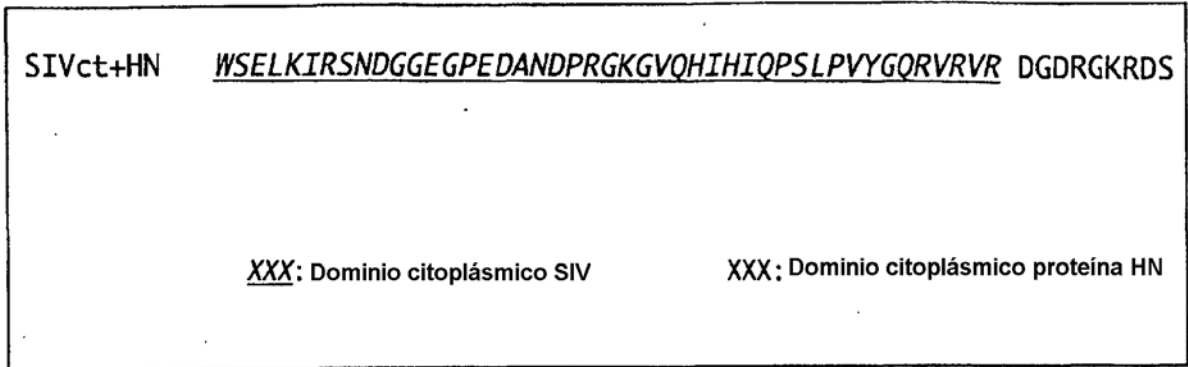


Figura 16

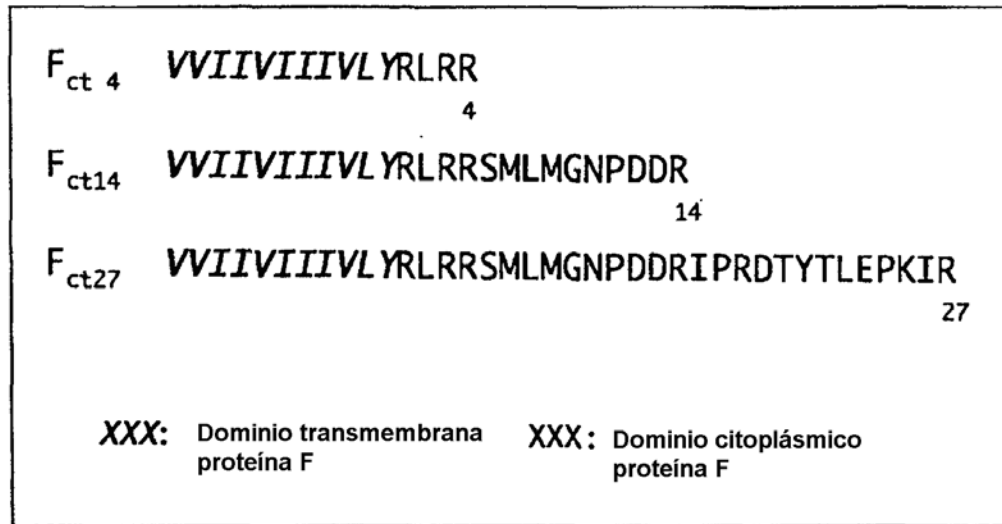


Figura 17

$F_{ct4}/SIV_{ct11}$	<i>WIIIVIIIIVLYRLRR</i>	<u><i>RVRQGYVPLSP</i></u>
$F_{ct14}/SIV_{ct11}$	<i>WIIIVIIIIVLYRLRRSMLMGNPDDR</i>	<u><i>RVRQGYVPLSP</i></u>
$F_{ct27}/SIV_{ct11}$	<i>WIIIVIIIIVLYRLRRSMLMGNPDDRI</i>	<u><i>RVRQGYVPLSP</i></u>
	<b>XXX:</b> Dominio transmembrana proteína F	
	<b>XXX:</b> Dominio citoplasmico proteína F	<u><b>XXX:</b></u> Dominio citoplásmico SIV 11 aminoácidos ( $SIV_{ct11}$ )



Figura 18

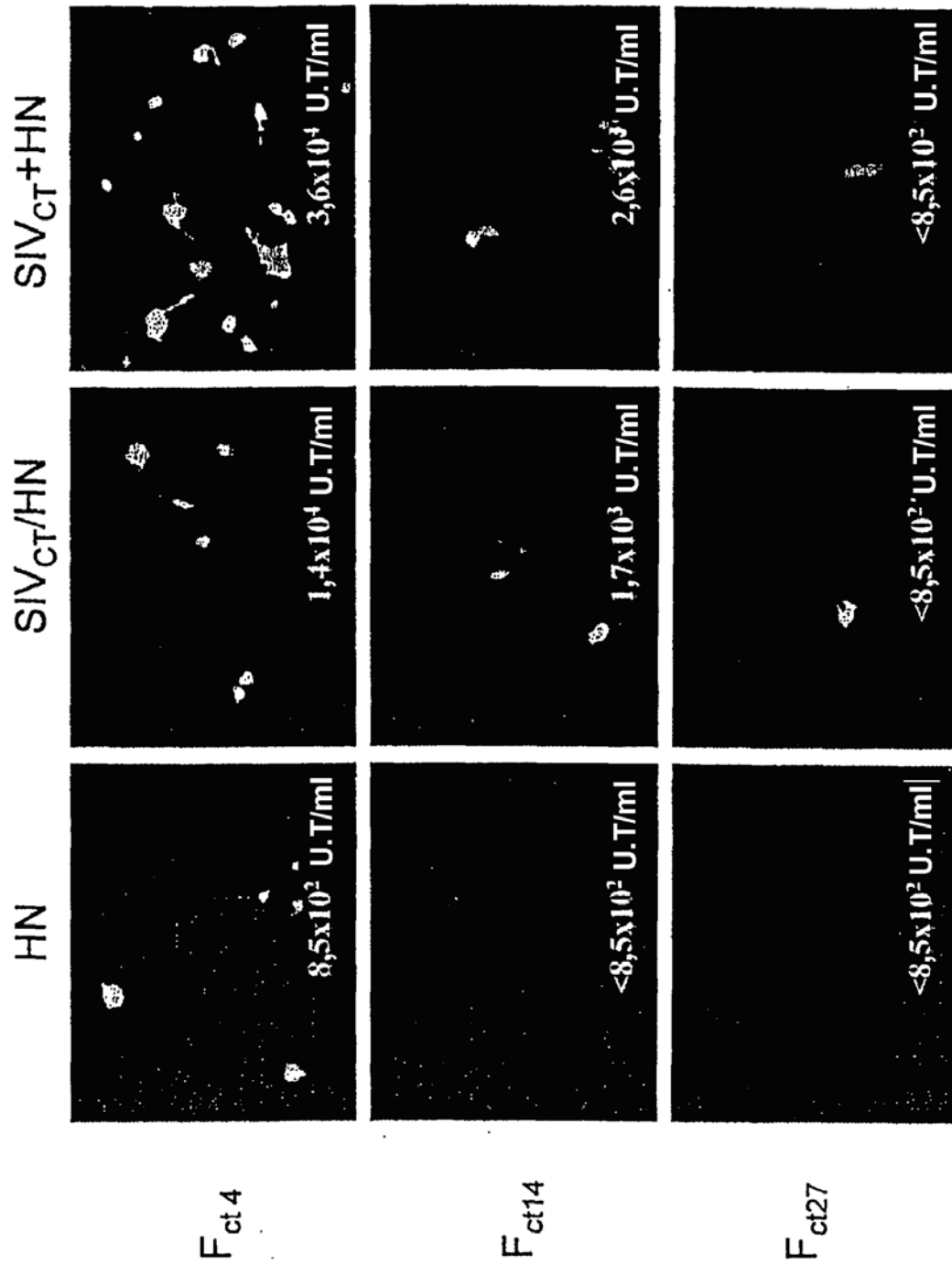


Figura 19

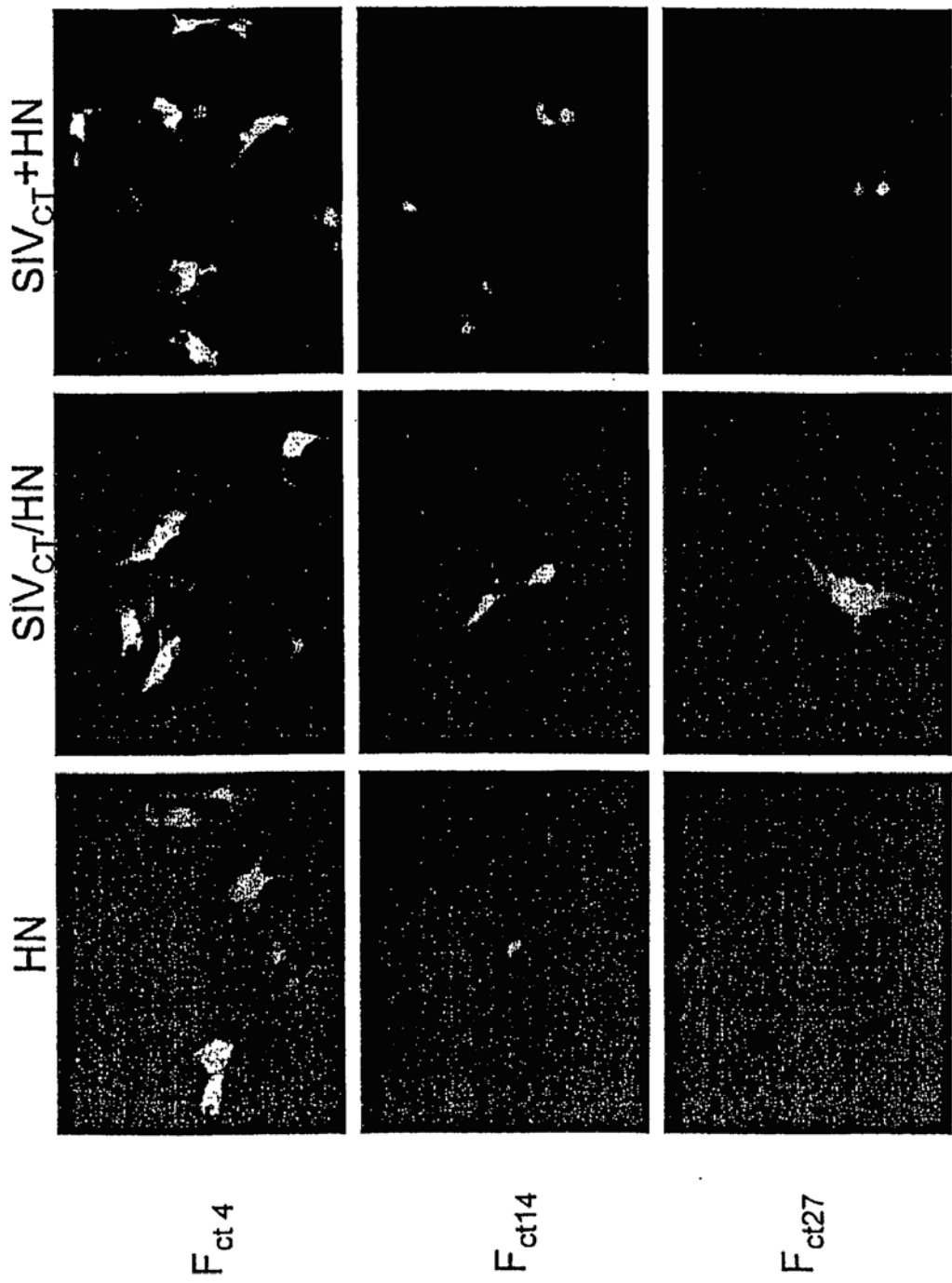


Figura 20

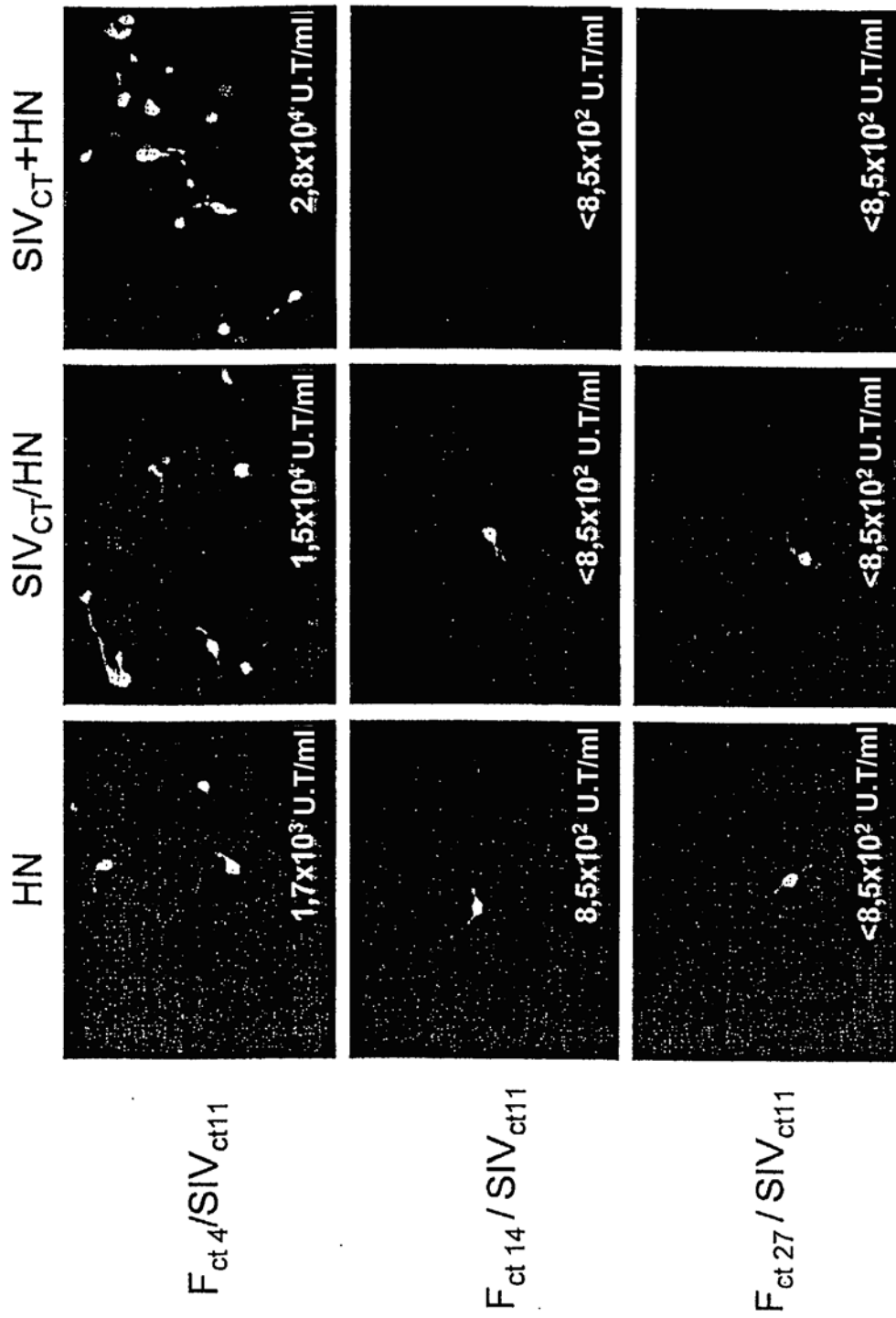


Figura 21

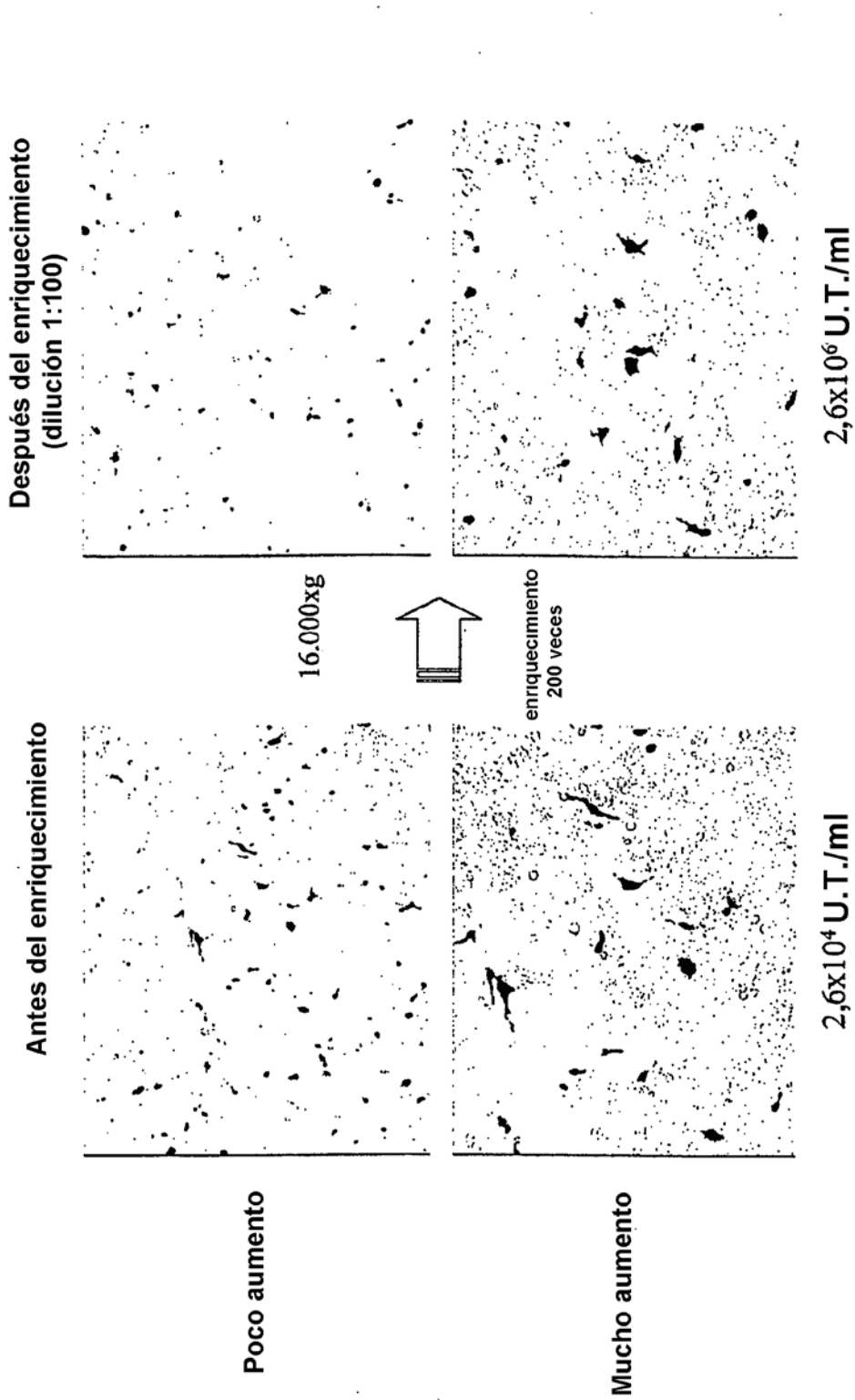
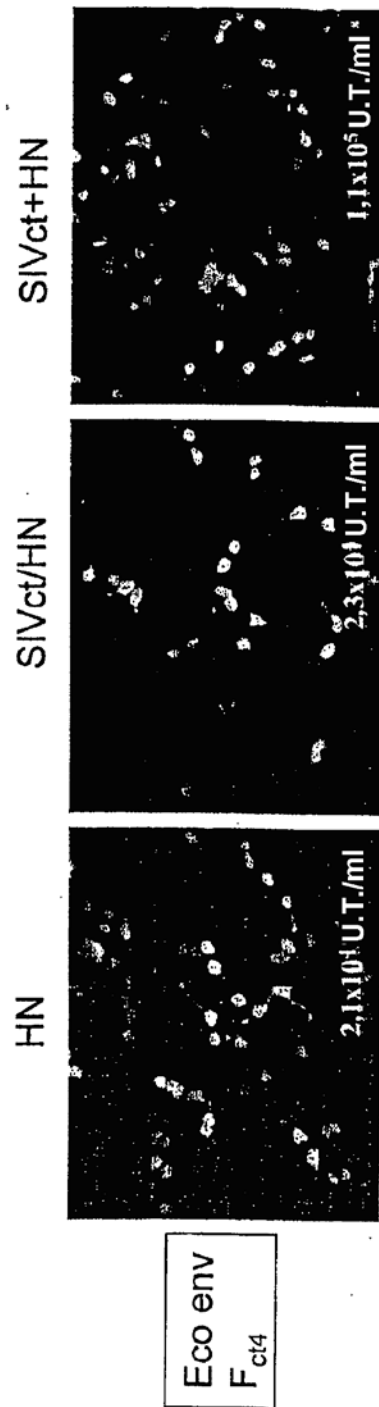


Figura 22



célula:293T

**Figura 23**



Figura 24

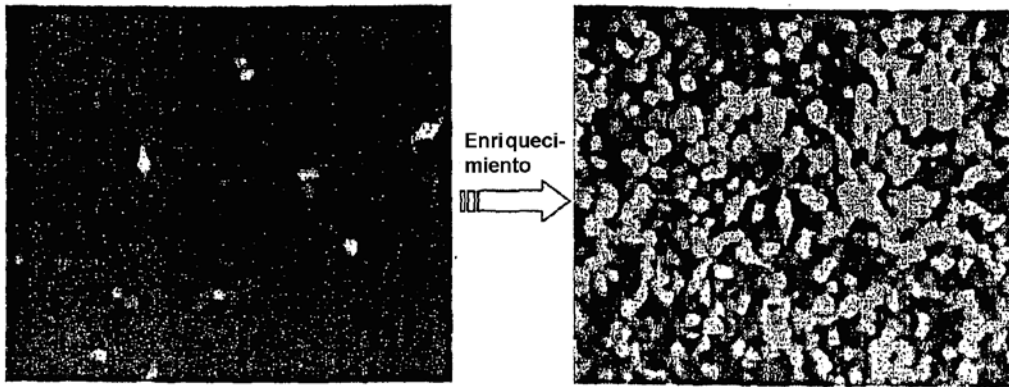


Figura 25

