

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 947**

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2011** **E 11752530 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014** **EP 2480678**

54 Título: **Producción estable de vectores lentivirales**

30 Prioridad:

02.09.2010 EP 10175088

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

16.05.2014

73 Titular/es:

MOLMED SPA (100.0%)
Via Olgettina 58
20132 Milan, IT

72 Inventor/es:

BOVOLENTA, CHIARA;
STORNAIUOLO, ANNA;
RIZZARDI, PAOLO y
MAVILIO, FULVIO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 460 947 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

Producción estable de vectores lentivirales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la producción de vectores lentivirales (LV) para terapia génica. Más en particular, la invención se refiere a líneas celulares estables de empaquetamiento lentiviral y a métodos de fabricación de las líneas celulares de empaquetamiento mediante el uso de un vector baculo-virus adenoasociado (AAV) híbrido para la integración estable de las proteínas lentivirales estructurales y reguladoras.

Antecedentes

10 Desde el primer ensayo clínico de fase I de LV contra el SIDA en 2001, han sido examinados detalladamente por las autoridades 38 ensayos de fase I-II y dos ensayos de fase II-III que aprovechan LV basados en HIV como vehículos de administración génica; tres de ellos todavía están bajo revisión. La mayoría de ensayos comprenden trastornos monogénicos, algunos de los cuales tienen una gran incidencia, tales como la anemia de Cooley, β -talasemia mayor (4 ensayos). Le siguen el cáncer y las enfermedades infecciosas, principalmente la infección por HIV-1. Normalmente, el número de pacientes inscritos en los ensayos de fase I/II es limitado, pero no en los ensayos de 15 fase III. Así, las líneas celulares de empaquetamiento estables para la 2ª (basadas en LTR) y 3ª (basadas en SIN) generación de LV son necesarias urgentemente para hacer frente a la demanda de producción a gran escala de LV para los ensayos de fase III, que se espera alcanzar en mayor número en el futuro. La producción de LV basada en protocolos transitorios es poco práctica, de hecho, para la aplicación global desde un punto de vista de seguridad, coste y reproducibilidad.

20 Un gran conjunto de pruebas indica que los LV, los vectores de integración viral desarrollados más recientemente para la terapia génica, son aplicables en general para transducir células diferenciadas de manera terminal o cíclicas, ideales para mantener la expresión del transgén a largo plazo y más seguras de lo que se temió inicialmente. La experiencia acumulada con vectores gamma-retrovirales (γ RV) del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) a lo largo de las últimas dos décadas dirigió el progreso rápido del sistema de administración de LV, cuyo desarrollo 25 se originó por la necesidad de superar la incapacidad de los retrovirus de transducirse en células que no están en división. En particular, la generación de vectores de transferencia auto-inactivantes (SIN) hace que la posibilidad del uso generalizado de LV en ensayos clínicos humanos sea más factible [1] y proporciona una expansión y optimización de un proceso de fabricación muy eficaz. Sin embargo, en contraste con γ RV, que se pueden producir mediante varias líneas celulares humanas y murinas de empaquetamiento disponibles comercialmente, los LV se producen actualmente no solamente para grado de investigación, sino también para grado GMP, casi exclusivamente mediante transfección transitoria. Esta tecnología es cara, difícil de estandarizar y aumentar de 30 escala, y requiere numerosos ensayos de validación posteriores. Además, el riesgo de lentivirus competentes de replicación (RCL), que surgen posiblemente por medio de la recombinación entre secuencias virales en las construcciones de vectores de empaquetamiento y transferencia, es un suceso poco frecuente, pero más probable durante la producción transitoria que durante la producción estable.

El desarrollo de una línea celular de empaquetamiento estable equivalente a la retroviral para LV resultó ser más lento y difícil porque, en contraposición a los gamma retrovirus, la expresión de las proteínas lentivirales, tales como env, proteasa, y ciertas proteínas secundarias es tóxica para las células humanas. Para superar este problema, los genes secundarios, presentes en las versiones muy tempranas de las células de empaquetamiento, se eliminaron 40 más tarde en las últimas generaciones. Las líneas celulares de empaquetamiento de LV basadas en SIV y HIV de primera generación se obtuvieron de células adherentes Vero de mono, o COS, HeLa y HEK293 humanas [2-5], modificadas con genomas de lentivirus que portaban unas pocas modificaciones cruciales, tales como la eliminación de la señal de empaquetamiento. El gp120 env y la mayoría de los genes secundarios, de hecho, se mantuvieron. El título de LV resultante fue muy bajo [2-5], y de manera más importante, la posible aplicación de estos vectores se limitó necesariamente a células T CD⁴⁺ para las aproximaciones de terapia génica anti-SIDA. Más tarde, se sustituyó gp120 env con la glicoproteína derivada del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), y se eliminaron todos los genes secundarios porque se demostró que eran prescindibles para una producción eficaz de LV. Para prevenir la toxicidad descrita también para VSV-G, su expresión se indujo de manera condicional mediante una diversidad de sistemas diferentes, tales como el Tet, ecdisona, rev y la combinación de Tet y cumato [20]. De forma similar, para 50 reducir el efecto tóxico de la proteasa viral durante la selección de clones, se ha descrito la expresión condicional del gen gag-pol mediante el Tet y la combinación de los fármacos doxiciclina y cumato [7]. En todos estos sistemas se integraron los genes gag-pol, rev y env mediante la transfección transitoria de ADN plasmídico, seguido de la selección con fármacos y la clonación celular.

Una de las cuestiones cruciales para la implementación de una línea celular de empaquetamiento realmente estable 55 es la elección de los mejores vehículos virales de administración génica. La mayoría de los investigadores integraron los genes gag-pol, rev y env mediante la transfección transitoria de ADN plasmídico, seguido de la selección con fármacos y la clonación celular [7-10]. Se sabe que esta tecnología sufre con el tiempo el silenciamiento génico y la pérdida de genes [11], lo que puede comprometer la estabilidad a largo plazo del clon de empaquetamiento.

Se han descrito vehículos alternativos de administración génica especialmente en STAR [12] y en las líneas celulares de empaquetamiento desarrolladas más recientemente GPRG-TL-20 [6] en las que los genes gag, pol, y rev se integraron en células HEK293T mediante vectores lanzadera de MLV. Se integraron de manera estable dos copias del gen gag-pol recodificado en STAR, mientras no hay disponible tal información para GPRG-TL-20 [6]. A diferencia de STAR, en el que se transfectó el gen env, en GPRG-TL-20 todos los genes virales restantes se introdujeron mediante SIN-MLV.

Existen varios sistemas que permiten la integración estable de un genoma exógeno en las células hospedadoras. Palombo et al., 1998 [13] describe un vector baculovirus-AAV híbrido para la integración específica en las células hospedadoras. Tal vector parece ser muy eficaz si incluye el gen rep en el mismo vector baculovirus-AAV híbrido. No se hace mención en esta referencia a la construcción de la presente invención, y aún menos la sugerencia de usar este tipo de sistema para la producción de LV.

A lo largo de prácticamente las últimas dos décadas, se han hecho varios intentos de generar líneas celulares de empaquetamiento de LV estables. A pesar de la diferente tecnología descrita, hasta ahora ninguna de estas líneas celulares de empaquetamiento se emplea en ensayos clínicos ni acapara el mercado todavía. Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas nuevos para la producción a gran escala de LV que sean eficaces en cuanto a la capacidad de producción y que sean seguros, económicos y reproducibles.

Compendio de la invención

La presente invención está relacionada con el campo de la producción de LV. Existen en desarrollo varios ensayos clínicos de terapia génica que emplean LV como vehículos de administración génica. En todos estos ensayos, la producción de LV se basa todavía en protocolos transitorios.

La presente invención proporciona una estrategia nueva para generar una línea celular de empaquetamiento basada en HIV-1. Tal estrategia se basa en el uso de un vector híbrido que comprende un esqueleto baculoviral que contiene un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV, el denominado sistema híbrido baculo-AAV, en combinación con un plásmido que codifica una proteína rep. Este sistema permite obtener una integración estable de las proteínas estructurales de HIV-1 gag/pol y rev. El sistema de la presente invención incluye a) un vector híbrido baculo-AAV caracterizado porque contiene dos casetes de expresión, uno que codifica los genes gag y pol lentivirales, y el otro rev lentiviral, y un marcador de selección, y b) un plásmido que codifica una proteína rep. El sistema propuesto representa una manera nueva y ventajosa de administrar proteínas de HIV-1 estructurales y reguladoras para modificar de manera estable y eficaz células hospedadoras con tales proteínas lentivirales. Mediante el uso de este sistema, se obtuvo un primer intermedio que incluía solamente las proteínas de HIV-1 estructurales y reguladoras gag/pol y rev, a usar como punto de partida para obtener líneas celulares de empaquetamiento de 2ª y 3ª generación que incluyen respectivamente la proteína reguladora (tat) y la proteína de la cubierta de interés, o solamente la proteína de la cubierta, así como líneas celulares productoras que incluyen también el vector de transferencia.

El primer intermedio porta dos copias de la construcción de empaquetamiento baculo-AAV recombinante que expresa los genes de HIV-1 gag-pol y rev en una configuración tri-cistrónica. Tal intermedio se ha denominado PK-7, y se denomina PK-7 en los ejemplos. La integración en el genoma del vector de empaquetamiento baculo-AAV se facilitó mediante la expresión transitoria de la proteína rep78 de AAV que se sabe que es necesaria para la integración del vector AAV mediada por ITR [14]. Tal primer intermedio mostró tener una estabilidad genética sorprendente durante 1 año de cultivo, que ha demostrado la producción continua de LV funcional tras la transfección transitoria de los elementos genéticos restantes. Además, no se ha observado ningún fenómeno de silenciamiento en tales células. Además, mediante la cartografía exacta del sitio de integración de los dos vectores AAV de empaquetamiento integrados en tándem en una región activa transcripcionalmente intergénica no codificante, se ha proporcionado un argumento de seguridad contra la posible activación de genes peligrosos cuyo mARN se puede incorporar en el LV y finalmente en las células objetivo hospedadoras.

A partir del primer intermedio, se pueden obtener líneas celulares de empaquetamiento estables de 2ª y 3ª generación. En particular, según la presente invención, se puede obtener una línea celular de empaquetamiento de 3ª generación integrando de manera estable en el primer intermedio PK-7 una proteína de la cubierta de interés, tal como env de MLV 4070, env de RD114 o env de GALV de retrovirus o derivados de las mismas. La integración estable se puede obtener mediante el uso de la administración de SIN-LV, pero se pueden usar otros vehículos de administración génica. Se obtuvo la línea celular de empaquetamiento relevante mencionada en el ejemplo PK-7-RD, integrando la proteína de la cubierta quimérica RD114-TR que contiene el dominio extracelular y transmembrana de la cubierta derivada del retrovirus endógeno felino y la cola citoplasmática de env de MLV 4070 [15]. La integración de la proteína de la cubierta quimérica RD114-TR se obtuvo mediante la administración de SIN-LV.

Para obtener las líneas celulares productoras de 2ª y 3ª generación, se integraron mediante administración secuencial SIN-Tat, SIN-Env y el vector de transferencia o solamente SIN-Env y el vector de transferencia, respectivamente. Conceptualmente, la integración de un vector cada vez, aunque conlleva tiempo, reduce el riesgo de recombinación homóloga, y por lo tanto la formación de RCL.

El sistema de empaquetamiento desarrollado basado en el uso de un vector baculo-AAV híbrido para la expresión estable de gag-pol y rev lentiviral se ha denominado "MolPack", y, por lo tanto, la línea celular productora de 2ª generación desarrollada con este sistema y que contiene RD114-TR y tat como proteína de la cubierta y proteína reguladora, respectivamente, y un vector de transferencia que codifica Chim3 como gen terapéutico se denomina en los ejemplos RD2-MolPack-Chim3.

Notablemente, el título de LV derivado de los clones RD2-MolPack-Chim3 es mayor de 2 unidades logarítmicas que el de LV producido a partir de las células de control HEK293T, lo que indica que RD2-MolPack-Chim3 genera más LV funcional en comparación con el LV equivalente producido mediante el protocolo transitorio, con la ventaja adicional de la producción por una línea celular productora estable que es económica y más segura.

Declaraciones de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un sistema para la expresión estable de proteínas estructurales y reguladoras lentivirales que consiste en:

i. un vector híbrido que comprende un esqueleto baculoviral que contiene un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral, y un marcador de selección con antibiótico y

ii. un plásmido de expresión que contiene el marco de lectura abierto (ORF) de Rep de AAV bajo el control de un promotor.

Preferiblemente, los dos casetes de expresión del vector híbrido están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A, preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1α, SFFV, y RSV, más preferiblemente el promotor es un promotor CMV IE. Según un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección se selecciona de los genes de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, o zeomicina, más preferiblemente el marcador de selección es el gen de resistencia a higromicina.

Preferiblemente, el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Preferiblemente, la proteína rep de AAV se selecciona de rep78 o rep68. Más preferiblemente, la proteína rep es rep78. Según otro aspecto de la invención, se proporciona una línea celular de empaquetamiento lentiviral semi-estable que consiste en una célula que expresa de manera estable gag pol y rev lentivirales, caracterizada porque tales células contienen integrada de manera estable en su genoma al menos una copia de un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo un rev lentiviral y un marcador de selección con antibiótico.

Preferiblemente, la célula es una línea celular humana seleccionada preferiblemente de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa, más preferiblemente la línea celular es HEK293-T.

Preferiblemente, los dos casetes de expresión están orientados cola-a-cola y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y una poli A; preferiblemente, el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1α, SFFV y RSV, más preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor CMV IE. Según un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección se selecciona de los genes de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a higromicina. Más preferiblemente, el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

Preferiblemente, la proteína rep de AAV se selecciona de rep78 o rep68. Más preferiblemente, la proteína rep es rep78. Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para obtener una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable que comprende:

i. preparar un vector híbrido (A) que comprende un esqueleto baculoviral que contiene un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral, y un marcador de selección con antibiótico y

ii. preparar un plásmido de expresión (B) que contiene el ORF de rep de AAV bajo el control de un promotor

iii. transfectar las células con el plásmido de expresión B y posteriormente infectar la célula con el vector híbrido A

iv. cultivar las células en presencia de antibiótico para la selección

v. obtener células que expresan de manera estable las proteínas gag, pol y rev

vi. integrar un gen env en tales células mediante el uso de un vector de expresión

vii. cultivar las células para obtener una línea celular que expresa de manera estable las proteínas gag, pol, rev y env. Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para obtener una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable que comprende:

- 5 i. preparar un vector híbrido (A) que comprende un esqueleto baculoviral que contiene un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral, y un marcador de selección con antibiótico y
- 10 ii. preparar un plásmido de expresión (B) que contiene el ORF de rep de AAV bajo el control de un promotor
- iii. transfectar una célula con el plásmido de expresión B y posteriormente infectar la célula con el vector híbrido A
- iv. cultivar las células en presencia de antibiótico para la selección
- v. obtener células que expresan de manera estable las proteínas gag, pol y rev
- 15 vi. integrar un gen tat lentiviral en tales células mediante el uso de un vector de expresión
- vii. cultivar las células para obtener una línea celular que expresa de manera estable las proteínas gag, pol, rev y tat
- viii. integrar un gen env en tales células mediante el uso de un vector de expresión
- 20 ix. cultivar las células para obtener una línea celular que expresa de manera estable la proteína gag, pol, rev, tat y env

Preferiblemente, los dos casetes de expresión del vector híbrido están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A, preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV, y RSV, más preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor CMV IE.

Preferiblemente, el gen tat es tat de HIV-1.

- 25 Según un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección se selecciona de un gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a higromicina, más preferiblemente el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

- 30 Preferiblemente, el gen env se integra en las células hospedadoras mediante el uso de un vector AAV, vector retroviral, integración de plásmido estable o recombinación homóloga. Según un aspecto más preferido, el gen env se integra mediante el uso de un vector lentiviral SIN.

Preferiblemente, el gen env se selecciona de env de MLV 4070, env de RD114, proteína de la cubierta química RD114-TR, proteína de la cubierta química RD114-pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos; más preferiblemente, el gen env es el gen que codifica la proteína de la cubierta química RD114-TR.

- 35 En una realización preferida se proporciona un vector lentiviral SIN que comprende un casete de expresión que contiene del extremo 5' al 3' un promotor CMV, el intrón de β -globina que contiene un elemento RRE en su secuencia y el ORF de RD114-TR, para la integración estable de la proteína de la cubierta química RD114-TR.

Preferiblemente, la proteína rep de AAV se selecciona de rep78 o rep68. Más preferiblemente, la proteína rep es rep78.

- 40 Según otro aspecto de la invención, se proporciona una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable que contiene integrado de manera estable en su genoma:

i. al menos una copia de un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral y un marcador de selección

ii. al menos una copia de env

- 45 Según el mismo aspecto de la invención, la línea celular de empaquetamiento lentiviral estable anterior comprende además al menos una copia del gen HIV-1-tat integrado de manera estable en su genoma.

Preferiblemente, la célula es una línea celular humana, preferiblemente la línea celular se selecciona de HEK293, HEK293-SF, HEK293-T, TE671, HT1080 o HeLa, más preferiblemente la línea celular es HEK293-T.

Preferiblemente, los dos casetes de expresión del casete de integración están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A, preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV, y RSV, más preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor CMV IE.

- 5 Según un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección se selecciona de un gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; preferiblemente, el marcador de selección es higromicina, más preferiblemente el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

Preferiblemente, el gen env se integra en las células hospedadoras mediante el uso de un vector AAV, vector retroviral, integración de plásmido estable o recombinación homóloga. Según un aspecto más preferido, el gen env se integra mediante el uso de un vector lentiviral SIN.

- 10 Preferiblemente, el gen env se selecciona de env de MLV 4070, env de RD114, la proteína de la cubierta quimérica RD114-TR, la proteína de la cubierta quimérica RD114-pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos, más preferiblemente el gen env es el gen que codifica la proteína de la cubierta quimérica RD114-TR.

Según otro aspecto, se proporciona un método para producir vectores lentivirales que comprende:

- 15 i. cultivar una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable que contiene integrado de manera estable en su genoma al menos una copia de un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral y un marcador de selección; y al menos una copia de env
- ii. Insertar en la línea celular de empaquetamiento estable un vector de transferencia

- 20 Preferiblemente, los dos casetes de expresión están orientados cola-a-cola y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A; preferiblemente, el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV y RSV, más preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor CMV IE. Preferiblemente, el marcador de selección se selecciona de un gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; más preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a higromicina. Más preferiblemente, el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

- 25 Preferiblemente, el gen env se selecciona de env de VSV-G, env de MLV 4070, env de RD114, proteína de la cubierta quimérica RD114-TR, proteína de la cubierta quimérica RD114pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos, más preferiblemente el gen env es el gen que codifica la RD114-TR.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una línea celular productora que contiene integrado de manera estable en su genoma:

- 30 i. al menos una copia de un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral y un marcador de selección
- ii. al menos una copia del gen env
- iii. un vector de transferencia

- 35 Según el mismo aspecto de la presente invención, la línea celular productora anterior contiene además el gen tat lentiviral integrado de manera estable en su genoma.

Preferiblemente, la célula es una línea celular humana seleccionada preferiblemente de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa, más preferiblemente la línea celular es HEK293-T.

- 40 Preferiblemente, los dos casetes de expresión del casete de integración están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A, preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV, y RSV, preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor CMV IE.

Según un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección se selecciona de un gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; más preferiblemente, el marcador de selección es higromicina, más preferiblemente el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

- 45 Preferiblemente, el gen env se integra en las células hospedadoras mediante el uso de un vector AAV, vector retroviral, integración de plásmido estable o recombinación homóloga. Según un aspecto más preferido, el gen env se integra mediante el uso de un vector lentiviral SIN.

- 50 Preferiblemente, el gen env se selecciona de env de MLV 4070, env de RD114, la proteína de la cubierta quimérica RD114-TR, la proteína de la cubierta quimérica RD114-pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos, más preferiblemente el gen env es el gen que codifica la proteína de la cubierta quimérica RD114-TR.

Según otro aspecto, se proporciona un método para producir vectores lentivirales que comprende cultivar una línea celular productora que contiene integrado de manera estable en su genoma:

- i. al menos una copia de un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral y un marcador de selección;
- ii. al menos una copia de env
- iii. al menos una copia de un vector de transferencia que codifica el gen de interés

Preferiblemente, los dos casetes de expresión están orientados cola-a-cola y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A; preferiblemente, el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV y RSV, más preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor CMV IE. Preferiblemente, el marcador de selección se selecciona de un gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; más preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a higromicina. Más preferiblemente, el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

Preferiblemente, el gen env se selecciona de env de VSV-G, env de MLV 4070, env de RD114, proteína de la cubierta quimérica RD114-TR, proteína de la cubierta quimérica RD114pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos, más preferiblemente el gen env es el gen que codifica la RD114-TR.

Descripción detallada de la invención

Se describirá una descripción detallada de las características y realizaciones preferidas de la invención a modo de ejemplo no limitante.

La invención puede ser puesta en práctica por una persona de experiencia habitual en la técnica que empleará, a menos que se indique de otra manera, las técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología. Tales técnicas se describen y se explican en la bibliografía publicada. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 y los suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); *Current Protocols in Immunology*, cap. 12, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press..

Sistema híbrido baculo-AAV

La presente invención proporciona una estrategia nueva para generar una línea celular de empaquetamiento basada en HIV-1. La optimización del sistema de producción para LV es una de las cuestiones críticas que es necesario resolver para el desarrollo de la medicina mediante terapia génica basada en la tecnología de LV. A pesar del número creciente de ensayos clínicos que emplean esta tecnología, los LV se producen todavía, en tales ensayos, mediante el uso de protocolos de transfección transitoria. De esta manera, la producción de LV todavía es muy cara e insatisfactoria para un gran número de pacientes. Por esta razón, se ha hecho un gran esfuerzo para desarrollar líneas celulares de empaquetamiento estables para LV. Una de las cuestiones críticas en el desarrollo de una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable es la elección del vehículo adecuado para modificar las células hospedadoras. En muchos casos, las células hospedadoras se han modificado mediante el uso de plásmidos, pero, en tales casos, también se ha observado la inestabilidad del genoma y fenómenos de silenciamiento génico. Se han usado vectores retrovirales para integrar de manera estable genes gag/pol y rev en otros dos casos. No se ha empleado ninguna de las líneas celulares de empaquetamiento estables desarrolladas hasta ahora en ensayos clínicos.

La estrategia de la presente invención se basa en el uso de un sistema para la expresión estable de proteínas estructurales y reguladoras lentivirales que consiste en un vector híbrido que comprende un esqueleto baculoviral que contiene un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral, y un marcador de selección; junto con un plásmido de expresión que contiene el ORF de rep de AAV bajo el control de un promotor. La presencia del esqueleto baculoviral permite albergar un casete de integración grande y complejo que incluye dos casetes de expresión que codifican varias proteínas diferentes. El vector de empaquetamiento baculo-AAV resultante permite modificar las células hospedadoras con las proteínas gag pol y rev, que son necesarias para producir de manera estable y eficaz LV, a través de un suceso de infección solamente.

La integración en el genoma de un vector de empaquetamiento baculo-AAV se obtuvo mediante la expresión transitoria de la proteína rep de AAV. Este sistema permitió obtener la integración de vectores AAV en una región

transcripcionalmente activa intergénica no codificante, excluyendo así la activación de genes peligrosos cuyo mRNA se puede incorporar en el LV y finalmente en las células objetivo hospedadoras.

El sistema propuesto representa una manera nueva y ventajosa de administrar proteínas de HIV-1 estructurales para modificar de manera estable y eficaz células hospedadoras con proteínas lentivirales estructurales y reguladoras. En una realización preferida, los dos casetes de expresión incluidos en la construcción de empaquetamiento baculo-AAV están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A, preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV, y RSV, más preferiblemente el promotor es un promotor CMV IE. Según un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección incluido en el empaquetamiento de AAV se selecciona de los genes de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; preferiblemente, el marcador es el gen de resistencia a higromicina, más preferiblemente el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

La integración en el genoma del vector de empaquetamiento baculo-AAV se obtuvo mediante la expresión transitoria de la proteína rep de AAV para la integración del vector AAV mediada por ITR. En una realización preferida, la proteína rep se selecciona de rep78 y rep68, más preferiblemente la proteína es rep78.

Mediante el uso de este sistema, fue posible obtener células modificadas para expresar de manera estable las proteínas de HIV-1 gag/pol y rev que se denominaron línea celular de empaquetamiento semi-estable. En particular, la presente invención describe y reivindica tales células modificadas y su uso para obtener líneas celulares de empaquetamiento de 2ª y 3ª generación que incluyen proteínas estructurales y reguladoras y la proteína de la cubierta de interés, y la línea celular productora incluye también el vector de transferencia, así como el método para producir las líneas celulares de empaquetamiento estables.

Línea celular de empaquetamiento semi-estable

La línea celular de empaquetamiento semi-estable de la presente invención consiste en células hospedadoras que portan al menos una copia de la construcción de empaquetamiento baculo-AAV recombinante que expresa los genes HIV-1 gag-pol y rev. La integración en el genoma del vector de empaquetamiento baculo-AAV se ha obtenido mediante la expresión transitoria de la proteína rep de AAV para obtener la integración del vector AAV mediada por ITR. Preferiblemente, los dos casetes de expresión están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A, y preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV y RSV. Más preferiblemente, el promotor constitutivo es un promotor CMV IE.

Según un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección se selecciona de un gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, zeomicina; preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a higromicina, más preferiblemente el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

Preferiblemente, la proteína rep de AAV se selecciona de rep78 y rep68. Más preferiblemente, la proteína rep es rep78. Las líneas celulares hospedadoras que se pueden modificar para obtener la línea celular de empaquetamiento semi-estable son líneas celulares humanas seleccionadas de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa, más preferiblemente la línea celular es HEK293-T.

Tal línea celular de empaquetamiento semi-estable es adecuada para la producción de una diversidad potencialmente grande de LV, con diferentes env y diferentes vectores de transferencia en un sistema de producción semi-estable. Por lo tanto, representa una gran ventaja para una producción más eficaz de vectores lentivirales ya que permite la reducción de los costes, no requiere el uso de ADN plasmídico de grado GMP que codifica gag-pol y rev, y se reduce el riesgo de formación de RCL secundaria a sucesos de recombinación entre los plásmidos durante la transfección transitoria.

La línea celular de empaquetamiento semi-estable de la presente invención demostró tener una estabilidad genética sorprendente durante 1 año de cultivo, que ha demostrado la producción continua de LV funcional tras la transfección transitoria de los elementos genéticos restantes. Además, no se han observado fenómenos de silenciamiento, de hecho, tanto el título como la infectividad de las partículas lentivirales obtenidas mediante el uso de este intermedio permanecieron inalterables después de 1 año. Tales datos se confirmaron tanto en presencia como en ausencia de presión selectiva. Notablemente, no existen en la bibliografía datos comparables con respecto a la estabilidad de la integración de un casete mediado por AAV-ITR. La única información relacionada es que una línea celular similar a fibroblastos, derivada de médula ósea humana, (células Detroit 6 de Ruddle) infectada con el serotipo 2 de AAV (AVV-2) de tipo natural mantuvo las secuencias virales en un estado latente durante al menos 47 y 118 pases [16,17]. Como se muestra en los ejemplos, la línea celular de empaquetamiento semi-estable de la presente invención sobrevivió durante al menos 102 pases.

Línea celular de empaquetamiento estable

La presente invención proporciona un método para obtener una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable. Tal método se basa en el uso de una construcción de empaquetamiento baculo-AAV para la integración estable de al menos una copia de un casete de integración que contiene dos casetes de expresión, uno que codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral, y un marcador de selección. La integración estable de este casete se

obtiene mediante la co-expresión de una proteína rep que permite la integración estable mediada por ITR en la célula hospedadora. La célula hospedadora así modificada se cultiva después en presencia de antibiótico y después se clona. La línea celular de empaquetamiento semi-estable obtenida es el punto de partida para la generación de una línea celular de empaquetamiento lentiviral de 2ª o 3ª generación. En particular, la línea celular de empaquetamiento estable de 3ª generación se obtiene integrando adicionalmente la proteína env deseada. La línea celular de empaquetamiento estable de 2ª generación se obtiene integrando primero la proteína Tat de HIV-1 y después la cubierta deseada.

La proteína de la cubierta y tat de HIV-1 se pueden integrar de manera estable en las células hospedadoras mediante el uso de un vector AAV, vector retroviral, la integración de un plásmido estable o la recombinación homóloga. Preferiblemente, las proteínas de la cubierta y tat de HIV-1 se integran en las células hospedadoras mediante el uso de un vector HIV-SIN. Se pueden usar varios tipos de proteínas de la cubierta, tales como env de MLV 4070, env de RD114, la proteína de la cubierta química RD114-TR, la proteína de la cubierta química RD114-pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de las mismas. Más preferiblemente, el gen env es el gen que codifica la proteína de la cubierta química RD114-TR.

Para obtener la integración estable de la proteína de la cubierta RD114-TR, se desarrolló inicialmente una construcción SIN que contenía el fragmento *Bam*HI-*Bam*HI derivado del plásmido pCMV-RD114-TR que porta el ORF de RD114-TR bajo control del promotor CMV. Esta construcción no generó la proteína RD114-TR. Un hallazgo inesperado durante la construcción del LV de SIN-RD114-TR fue descubrir que el intrón de β -globina se debe incluir forzosamente entre el promotor CMV y el ORF de RD114-TR. En general, la mayoría de los casetes de expresión génica celulares y virales protegidos en un contexto SIN-LV están desprovistos de elementos intrónicos, debido al riesgo de corte y empalme entre la SD del vector y la SA del intrón, y la escisión consiguiente del promotor contenido en el casete de expresión. Para evitar esta dificultad, se generó un nuevo SIN-LV que portaba dos elementos RRE, uno en la configuración canónica de SIN-LV entre las secuencias SD y SA y uno dentro del intrón de β -globina.

Basándose en estos hallazgos, se propuso que la necesidad inesperada del intrón de β -globina para obtener la producción de RD114-TR puede reflejar la presencia de inestabilidad o secuencias negativas en el ORF de RD114-TR o en el fragmento de 328 pb que abarca la región del codón de parada de RD114-TR y el sitio de enzima de restricción 3'*Bam*HI presente en la construcción SIN-RD114-TR. El análisis de secuencias asistido GeneOptimizer® llevado a cabo por GENEART AG (Regensburg, Alemania) determinó que los codones con un mal uso de codones estaban distribuidos por todo el gen RD114-TR y el fragmento de 328 pb, dando razón a la suposición. Además, el análisis de optimización de codones indicó que el índice de adaptación de codones (CAI) mejoró de 0,65 a 0,98 (en donde un CAI de 1 es el óptimo). Por lo tanto, en principio, una aproximación alternativa y más simple para integrar RD114-TR en RD-MolPack mediante el uso de vectores SIN basados en MLV o basados en HIV podría ser el uso de RD114-TR recodificado. Así, se han preparado y ensayado construcciones que contienen secuencias con codones optimizados. Al contrario, se descubrió que la optimización de codones permite la traducción de la proteína precursora (PR) de RD114-TR, incluso en ausencia del intrón de β -globina, pero, inesperadamente, el nivel elevado de PR no es procesado por furina en las subunidades SU y TM debidas. Por lo tanto, RD114-TR se ha integrado eficazmente en la línea celular de empaquetamiento mediante el uso de un vector SIN basado en HIV que incluye el intrón de β -globina en la construcción entre el promotor CMV y el ORF de RD114-TR. En una realización preferida, se proporciona un SIN-LV que comprende un casete de expresión que contiene del extremo 5' al 3' un promotor CMV, el intrón de β -globina que contiene un elemento RRE en su secuencia y el ORF de RD114-TR.

La presente invención proporciona un método para producir LV que comprende:

- i. Cultivar una línea celular de empaquetamiento estable como se describió anteriormente
- ii. Insertar en la línea celular de empaquetamiento semi-estable un vector de transferencia

La producción de LV empleada actualmente en ensayos clínicos todavía se basa en la transfección transitoria de todas las proteínas necesarias. Al contrario, los métodos y las líneas celulares de empaquetamiento de la presente invención permiten una producción estable. En particular, el sistema de expresión híbrido baculo-AAV usado en el método de la presente invención permite de manera ventajosa una introducción estable y segura de proteínas de HIV-1 estructurales (gag/pol) y reguladoras (rev), solamente en una ronda de transfección/infección y clonación. El intermedio obtenido con tal sistema de expresión es estable, no muestra fenómenos de silenciamiento y permite desarrollar líneas celulares de empaquetamiento de 2ª y 3ª generación que son una herramienta muy importante para el desarrollo de protocolos rápidos y eficaces para la producción de LV. Las líneas celulares de empaquetamiento estables de la presente invención se pueden usar para una producción económica y más segura. De hecho, la ausencia total de transfección permite una reducción de costes y reduce la posibilidad de sucesos de recombinación, que conducen potencialmente a la formación de RCL. Además, se ha descubierto que las líneas celulares de empaquetamiento estables obtenidas con el método de la invención son capaces de producir LV con un título como mínimo comparable o incluso mayor que los LV producidos con los protocolos transitorios.

Línea celular productora

La línea celular productora se puede conseguir integrando de manera estable un vector de transferencia que codifica el gen de interés (GOI) en una línea celular de empaquetamiento estable como se describió anteriormente. La presente invención proporciona además un método para producir LV que comprende cultivar tal línea celular productora.

De manera notable, el título medio y la infectividad del LV producido a partir de la línea celular de empaquetamiento estable de 2ª generación mencionada en el ejemplo como los clones RD2-MolPack-Chim3 es mayor de 2 unidades logarítmicas que la del LV producido a partir de las células de control HEK293T, lo que indica que RD2-MolPack-Chim3 genera LV más funcional en comparación con el LV equivalente producido mediante un protocolo transitorio. El clon RD2-MolPack-Chim3.14 es interesante, ya que crece espontáneamente en suspensión y produce LVs con un título de $1,0 \times 10^6$ TU/ml en células SupT1 y de $0,5 \times 10^6$ TU/ml en HSCs CD34⁺.

Descripción de las figuras

Figura 1 Esquemas del desarrollo de RD-MolPack. (a) Representación esquemática de los plásmidos de ADN usados en el estudio. pPolh, promotor de polihedrina; attB1, unión B1; ITR, repetición terminal invertida; CMV, promotor de citomegalovirus; In, intrón; RRE, elemento sensible rev; A, secuencia de poliA; IRES, sitio interno de entrada al ribosoma; SD, donante de corte y empalme; SA, aceptor de corte y empalme; Ψ, señal de empaquetamiento; WPRE, elemento regulador post-transcripcional de la hepatitis de marmota canadiense; cPPT, tramo de polipurina central; hPGK, promotor de fosfoglicerato quinasa humana. (b) Esquema de la integración genómica mediada por Rep78 del vector AAV-GPR. Rep78 de AAV estimula la escisión del casete AAV-GPR flanqueado por ITR y facilita su integración en los cromosomas humanos. (c) Diagrama de flujo de la estrategia de desarrollo de líneas celulares de empaquetamiento estables RD-MolPack de 2ª o 3ª generación.

Figura 2 Caracterización de los clones PK. (a) Análisis de transferencia de Southern de la integración del vector AAV-GPR. Para establecer el número de copias y la integridad del casete, se digirió el ADN genómico (10 µg) derivado de los clones PK con dos enzimas de restricción diferentes, *Bam*HI y *Sna*BI, respectivamente. (b) Análisis de transferencia de Western de las proteínas virales producidas a partir del casete GPR. Panel izquierdo, los extractos celulares (50 µg/carril) obtenidos de los clones PK se hibridaron con un suero anti-HIV-1 humano que reconoce las proteínas de HIV-1. La membrana se hibridó de manera secuencial con un Ab específico anti-rev. Panel derecho, 30 ng de equivalente de p24Gag de partículas similares a virus (VLP) producidas a partir de clones PK se procesaron de manera idéntica a los extractos celulares. (c) Cartografía esquemática de la integración del casete GPR mediante la técnica LM-PCR que identificó el punto de ruptura del ADN en el brazo largo del cromosoma 2 en la localización 2q32.1. (d) Co-localización del casete AAV-GPR y el gen Hox4 humano en el cromosoma 2. La hibridación in situ de cromosomas en metafase de PK-7 se llevó a cabo mediante el uso de una sonda específica de gag (rojo) y específica de Hox4 (verde), respectivamente. (e) Representación esquemática del reordenamiento de los dos casetes GPR integrados en el clon PK-7 y su orientación cola-a-cabeza.

Figura 3 Expresión de Tat en clones PK-7-Tat. (a) Análisis de transferencia de Western de extractos nucleares (50 µg/carril) obtenidos a partir de células PK-7-Tat en bruto y cinco clones derivados. La membrana se hibridó con el Ab específico anti-tat y, después de la eliminación, con el Ab anti-YY1, que detecta el factor de transcripción nuclear constitutivo, YY1, como control interno. (b) Se midió la producción de p24 gag expresado por célula a partir de los clones seleccionados mediante ELISA. (c) Análisis de transferencia de Southern del ADN genómico de RD2-MolPack-Chim3.14 de la integridad de los vectores SIN-LV-Tat, SIN-LV-RD114-TR y LTR-LV-Chim3. El número de copias del vector de los tres vectores calculado mediante PCR TaqMan se indica entre paréntesis. (d) Gráfico de la viabilidad celular de células RD2-MolPack-Chim3.14 cultivadas en diferentes % de FCS tal como se indica en la leyenda durante casi dos meses.

Figura 4 Análisis de la expresión de la cubierta RD114-TR. (a) Ensayo de transferencia de Western para detectar la expresión de RD114-TR a partir de diferentes construcciones. Se transfectaron de manera transitoria (TF) células PK-7 con el plásmido CMV-RD114-TR (carril 1), y el extracto celular completo correspondiente se usó como control positivo. SIN-RD114-TR (carriles 2 y 3), pIRES-RD114-TR-WT y pIRES-RD114-TR con codones optimizados (CO) (carriles 4 y 5), SIN-RD114-TR-IN (carriles 6 y 7) SIN-RD114-TR-IN-RRE (carriles 8 y 9), SIN-RD114-WT-TR-IN-RRE y SIN-RD114-TR-CO-IN-RRE (carriles 12 y 13) se transfectaron (TF) en células PK-7 o se empaquetaron como vector de transferencia en LV pseudotipado con VSV-G, generado mediante transfección triple estándar de HEK293T. Los LV que contenían SIN-RD114-TR se usaron después para espinocular células PK-7 (TD). Los carriles 1-9, 12 y 13 corresponden a los extractos celulares (50 µg/carril); los carriles 10 y 11 corresponden a LV (30 ng de equivalente de p24gag/carril). Los filtros se analizaron con sonda con un Ab anti-RD114-TR, que reconoce el precursor (PR) y la subunidad transmembrana (TM), pero no la subunidad superficial (SU) de la cubierta quimérica. La banda TM* corresponde a una subunidad transmembrana más corta obtenida tras la escisión dependiente de proteasa viral. (b) Análisis de transferencia de Western de la cubierta RD114-TR en tres clones PK-7-Tat7-RD. Panel izquierdo, los extractos celulares (40 µg/carril) se analizaron con sonda con el Ab anti-RD114-TR. Después de la eliminación, las membranas se hibridaron con un Ab anti-p24gag para determinar la proporción relativa de RD114-TR por nivel de p24gag. Panel derecho, 30 ng de equivalente de p24gag de LV producido a partir de clones PK-7-Tat-RD se procesaron de forma similar a los extractos celulares. Los números entre paréntesis indican las copias del

vector SIN-RD114-TR-IN-RRE integrado. (c) Análisis de transferencia de Western de la cubierta RD114-TR en tres clones PK-7-RD. Panel izquierdo, los extractos celulares (40 µg/carril) se analizaron con sonda con el Ab anti-RD114-TR. Después de la eliminación, la membrana se hibridó con un Ab anti-p24gag. Panel derecho, 30 ng de equivalente de p24gag de LV producido a partir de los clones PK-7-RD se procesaron de forma similar a los extractos celulares. Los números entre paréntesis indican las copias del vector SIN-RD114-TR-IN-RRE integrado. (d) Análisis de transferencia de Western de la cubierta RD114-TR en tres subclones PK-7-RD26. Panel izquierdo, los extractos celulares (40 µg/carril) se analizaron con sonda con el Ab anti-RD114-TR. Después de la eliminación, la membrana se hibridó con un Ab anti-p24gag. Panel derecho, 30 ng de equivalente de p24gag de LV producido a partir de los subclones PK-7-RD26 se procesaron de forma similar a los extractos celulares. Los números entre paréntesis indican las copias del vector SIN-RD114-TR-IN-RRE integrado en el panel izquierdo, y el título del LV generado a partir de los subclones tras la transfección del vector de transferencia SIN-GFP en el panel derecho.

Figura 5 Análisis del ADN genómico Baculo-AAV-GPR y de la integración de ADN residual supuesta de Rep78. (a) Análisis de transferencia de Southern del ADN de baculovirus-AAV recombinante. El ADN se extrajo de partículas de baculovirus, se digirió durante la noche con la enzima de restricción *MluI* y, tras la transferencia, se analizó con la sonda específica del casete GPR de 11 kb. Se cargó el plásmido de entrada GPR (1 pg) y ADN vacío de baculovirus (100 ng) como controles positivo y negativo, respectivamente. (b) Detección de la integración de ADN plasmídico rep78 residual supuesta en células PK-7. Se llevó a cabo una PCR específica de Rep78 mediante el uso del ADN genómico de PK-7 como molde de muestra y el plásmido CMV-Rep78 (1 pg) como control positivo.

Figura 6 Transcripción de los vectores SIN-RD114-TR y SIN-RD114-TR-IN. Análisis de transferencia de Northern de la expresión del ARN de RD114-TR tras la transfección transitoria de los vectores SIN-RD114-TR en células HEK293T en presencia (carriles 2 y 4) o ausencia (carriles 1 y 3) de plásmido Rev extra (2,5 µg). Cuarenta y ocho horas tras la co-transfección, se extrajo el ARN total (5 µg) de las células HEK293T y se hibridó con la sonda específica de RD114-TR. FL, tamaño completo; Exp. FL, tamaño completo esperado del vector SIN-RD114-TR-IN, que se espera que sea 800 pb más largo que SIN-RD114-TR por la presencia del intrón de β-globina. Se usó un fragmento de RD114-TR de 550 pb como sonda específica.

Ejemplos

Ejemplo I: Métodos generales

Plásmidos

Los genes gag, pol y rev de HIV-1 de tipo natural se extrajeron mediante digestiones con *MluI/NarI* y *MluI/NotI* de los plásmidos pCG719-pKlgagpol (en adelante denominado CMV-GPR por simplicidad) (Figura 1a, esquema 13) y pCG720-pKrev (CMV-Rev) (Figura 1a, esquema 9), respectivamente [27]. Los genes virales se insertaron en el vector lanzadera Gateway® pENTR™4 (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA) en dos casetes de expresión diferentes en orientación cola-a-cola, y cada casete estaba controlado por un promotor CMV IE y portaba una secuencia de poliA. El primer casete expresa los genes gag y pol, mientras el segundo el gen rev y el marcador de selección del gen de resistencia a higromicina (hygro); hygro se clonó en posición 3' respecto de un IRES para permitir la traducción bicistrónica. Las dos unidades de expresión se introdujeron en el sitio *XbaI* del plásmido pSUB201 recombinante que portaba un genoma de AAV infeccioso [18]. El casete 5'ITR-CMV-GagPol-polyA-polyA-hygro-IRES-Rev-CMV-ITR3' resultante se extrajo después y se insertó en el vector lanzadera Gateway® pENTR™4. El vector de empaquetamiento baculo-AAV híbrido recombinante (Baculo-AAV-GPR) (Figura 1a, esquema 1) se obtuvo por medio del sistema de recombinación específico de sitio del bacteriófago lambda entre el vector de entrada lanzadera pENTR™4, que contenía los dos casetes, y el ADN lineal BaculoDirect (BaculoDirect™ Baculovirus Expression Systems, Invitrogen, Co.). Durante la recombinación homóloga, el gen de polihedrina del ADN baculoviral se sustituyó así con el casete doble GPR. El plásmido de expresión pABCMV-Rep78 (CMV-AAV-Rep78) se obtuvo clonando el ORF de AAV-rep78 bajo el promotor CMV IE del vector de expresión pABS.43 como se describe en Recchia et al., 2004 [19] (Figura 1a, esquema 8). El plásmido pMD.G (CMV-VSV-G) [20] codifica la glicoproteína de la cubierta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (Figura 1a, esquema 10). El vector de transferencia de 3ª generación, pCCLsin.PPT.hPGK.eGFP.WPRE.Amp (SIN-eGFP) [21] expresa el gen eGFP bajo el promotor constitutivo hPGK (Figura 1a, esquema 6). El vector de transferencia de 2ª generación ΔN-Chim3 que expresa el transgén anti-HIV-1 Chim3 se describió en Porcellini et al., 2009 y 2010 [23,24] (Figura 1a, esquema 7). Los vectores SIN-RD114-TR (Figura 1a, esquemas 3-5) se construyeron siguiendo estrategias diferentes mediante el uso del ORF de RD114-TR extraído del plásmido pCMV-RD114-TR (CMV-RD114-TR) (Figura 1a, esquema 11), que codifica la cubierta RD114-TR quimérica, hecha de los dominios extracelular y trans-membrana de la cubierta del retrovirus endógeno felino RD114 y la cola citoplasmática (TR) del A-MLVenv 4070A [22]. Brevemente, los casetes CMV-RD114-TR, CMV-RD114-TR-IN y CMV-RD114-TR-IN-RRE se clonaron cada uno en el sitio *MluI* del vector SIN-poly*MluI*, una versión modificada del vector SIN-eGFP en la que se eliminó el casete hPGK-eGFP y se sustituyó con el polilígador *EcoRV-MluI-SmaI-MluI-NotI-SacI-BglII-BamHI-SalI*. Las construcciones SIN-RD114-TR-IN y RD114-TR-IN-RRE (Figura 1a, esquema 4 y 5, respectivamente) contienen el intrón de β-globina de conejo presente en el vector CMV-RD114-TR (Figura 1a, esquema 11). En el SIN-RD114-TR-IN-RRE, el elemento RRE de 230 pb, amplificado mediante PCR como se describió en la sección "análisis mediante PCR", se integró en el sitio *Scal* del elemento del intrón de β-globina. La construcción pCMV-ΔR8.74 (CMV-GPRT) de empaquetamiento de 2ª generación (Figura 1a, esquema 12) codifica los genes gag, pol, rev y tat de HIV-1 [25]. El vector SIN-Tat (Figura 1a,

esquema 2) se construyó insertando el gen tat, derivado del plásmido CMV-GPRT (Figura 1a, esquema 12), en el sitio *EcoRI* de pIRESpuro3 (Clontech Laboratories Inc., TakaraBio Company, Mountain View, CA) y después clonando el casete CMV-Tat-IRES-puro bi-cistrónico en el *MluI* del vector SIN-polyMluI.

Células

- 5 Se cultivaron células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (Invitrogen, Co.) en suspensión en medio TC-100 (Invitrogen, Co.) complementado con un 10% de FCS (EuroClone Ltd, R.U.) y una combinación de penicilina-estreptomicina y glutamina (PSG) a 27 °C en ausencia de CO₂. Las células renales embrionarias humanas 293T (HEK293T) y sus clones derivados (PK-7 y derivados PK-7) se propagaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con un 10% de FCS y PSG. Las células CEM A3.01 y SupT1 T se cultivaron en RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS y PSG. Se purificaron células madre hematopoyéticas (HSC) CD34⁺ y leucocitos neonatales a partir de una centrifugación de sangre de cordón umbilical (UCB) en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega). Tras la separación en gradiente, se aislaron las HSC CD34⁺ de la capa de células mononucleadas de UCB recogidas mediante selección positiva con el uso de un equipo CD34 MicroBeads y columnas separadoras MiniMACS (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA). Se estableció la pureza de las células CD34⁺ (>92%) mediante análisis FACS (FACSCalibur BD Bioscience, San Jose, CA) y el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR), mediante el uso del Ab anti-CD34-PE (BD Pharmingen™, San Diego, CA). Las células CD34⁺ se pre-estimularon durante 24 horas en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) con un 20% de suero que contenía factor de células madre humanas (h-SCF) 100 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN), h-Flt3L 100 ng/ml (Peprotech, Rocky Hill, NJ), h-IL-6 20 ng/ml (R&D Systems) y trombopoyetina humana (h-Tpo) 20 ng/ml (Peprotech) y se mantuvieron en el mismo medio durante la transducción. Los leucocitos neonatales se estimularon durante 48 horas con el anti-CD3 humano soluble (30 ng/ml) (Orthoclone OKT3, Janssen-Cilag, R.U.) e IL-2 humana recombinante (rhIL-2) 50 U/ml (Chiron, Emeryville, CA) en RPMI y después se mantuvieron en RPMI complementado con un 10% de FCS, PSG, y rhIL-2.

- 25 El clon RD2-MolPack-Chim3.14 se adaptó para crecer en medio de Dulbecco (DMEM) que contenía un 2,5% de FCS como sigue: las células se cultivaron en matraces de agitación de 125 ml en un agitador rotatorio a 120 rpm a 37 °C en una atmósfera de aire humidificado con un 5% de CO₂, a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/ml. La viabilidad se mantuvo $\geq 70\%$, las células se dividieron a $0,5 \times 10^6$ células/ml, y el medio se cambió diariamente. A lo largo de los múltiples pases se disminuyó el FCS del 10% al 5% al 2,5%; cada cambio de suero se llevó a cabo después de al menos dos pases de cultivo.

- 30 Producción de Baculovirus e infección con baculo-GPR de células HEK293T

- Los baculovirus, que portaban el genoma de ADN Baculo-AAV-GPR híbrido recombinante, se produjeron siguiendo el método BaculoDirect mediante el uso del sistema de ADN de Baculovirus adaptado de Gateway® (Invitrogen, Co.). El título de Baculovirus recombinante se determinó mediante un ensayo de placas, y correspondió a 1×10^{11} ufp/ml tras tres pases de amplificación viral en células Sf9. El clon PK-7 se obtuvo transfectando $1,5 \times 10^6$ células HEK293T con 4 µg de plásmido de expresión AAV-rep78 y 24 horas después se infectaron con el Baculo-AAV-GPR recombinante a un MOI de 1.000. Las células se mantuvieron sin higromicina durante 4 días y después se sembraron 5×10^5 células en 22 placas de 10 cm en presencia de higromicina (100 µg/ml) a concentraciones diluidas en serie. Las 22 placas se cribaron en función de la producción de p24gag mediante ELISA. Solamente una placa, en la que las células se sembraron a $3,7 \times 10^4$ células/placa, liberó suficiente p24gag en el sobrenadante. La placa contuvo 40 colonias que se recogieron y se cribaron. Tres de ellas, que fueron positivas para la producción de p24Gag, se caracterizaron adicionalmente.

Producción y titulación de LV

- Los LV pseudotipados producidos a partir de células HEK293T se obtuvieron mediante la co-transfección transitoria de los plásmidos siguientes: las construcciones de empaquetamiento CMV-GPR (3ª generación) [o CMV-GPRT (2ª generación)], las construcciones de la cubierta VSV-G o RD114-TR, y los vectores de transferencia de 3ª generación SIN-eGFP [26] o de 2ª generación PΔN-Chim3 [23] o PΔN-eGFP. La proporción empaquetamiento:cubierta:vector de transferencia fue 6,5:3,5:10 µg de ADN, a menos que se indique de otra manera. Se generaron LV a partir del clon PK-7 co-transfectando el plásmido que expresaba env y el vector de transferencia, mientras los LVs producidos a partir de los clones PK-7-RD y PK-7-Tat7-RD se obtuvieron transfectando solamente el vector de transferencia adecuado. Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo con el método estándar de Ca⁺⁺-fosfato o el sistema Eugene6™ siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) obteniendo resultados similares. Los sobrenadantes se recogieron 48 horas después de la transfección y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm. El título se calculó con SupT1, CEM A3.01, células mononucleares de sangre periférica activadas primarias (PBMC) y HSC CD34⁺ derivadas de sangre de cordón umbilical, dependiendo del tipo de experimentos. Brevemente, SupT1 y las células mononucleares primarias activadas se transdujeron mediante dos ciclos de espinoculación (1,240 × g durante 1 hora) en presencia de polibreno (8 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) separados por una fase de reposo nocturna; las HSCs CD34⁺ se transdujeron durante 24 horas en placas revestidas con retronectina (Takara Bio, Otsu, Japón) sin polibreno. La eficacia de la transducción se monitorizó mediante un análisis de citometría de flujo (FACS Calibur BD Bioscience, San José, CA) de la expresión de eGFP (SIN-eGFP) o la expresión de ΔLNFRG (PΔN-Chim3), como se describió en Porcellini et al., 2009 y 2010 [23,24],

mediante el uso del programa informático FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Solamente se usaron los valores de transducción que oscilaron del 5 al 20% de células positivas para calcular el título de cada preparación de LV según la fórmula siguiente: $TU = [\text{número de células} \times (\% \text{ de GFP}/100)]/\text{vol. sob. (en ml)}$.

Protocolo de cribado de clones basado en el título

- 5 Para acelerar la selección, se cribaron todos los subclones derivados de PK-7 calculando el título de LV de sus sobrenadantes. Se estableció una co-transfección de uno o dos plásmidos basada en Ca^{++} -fosfato a pequeña escala para generar LV, cuya potencia se calculó después en células SupT1 mediante un protocolo de transducción a pequeña escala. Brevemente, se sembraron 6×10^4 células derivadas de PK-7/pocillo en placas de 48 pocillos, y 24 horas más tarde se co-transfectaron con los plásmidos restantes necesarios para obtener LV funcionales. Cuarenta y ocho horas tras la transfección, se usaron 200 μl de sobrenadante de cultivo para transducir 3×10^4 células SupT1/pocillo sembradas a la concentración de $7,5 \times 10^4$ células/ml. El umbral del título se impuso a $\geq 1 \times 10^2$ TU/ml.

Ensayos de transferencia de Northern y Southern

- 15 Ensayo de transferencia de Northern. El ARN total se extrajo mediante el reactivo Trizol (Life TechnologiesTM Inc., Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sometieron a electroforesis cinco μg /muestra en un gel de un 0,8% de agarosa-formaldehído, se transfirieron a una membrana Hybond-N mediante transferencia capilar, y finalmente se analizaron con 1×10^6 dpm/ml de una sonda de RD114-TR de 550 pb marcada con ^{32}P en tampón de hibridación PerfectHyb PLUS (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). Después de lavados exhaustivos, las membranas se expusieron a películas de rayos X a -70°C .
- 20 Ensayo de transferencia de Southern. Se aisló el ADN genómico (gADN) mediante el equipo QIAamp Mini (QIAGEN GmbH, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se extrajo el ADN de Baculovirus de las partículas virales mediante el equipo QIAamp DNA micro (QIAGEN). Tras una digestión durante la noche con las enzimas de restricción indicadas, se sometieron a electroforesis 10 μg de gADN en un gel de agarosa del 0,8%, se transfirieron mediante transferencia capilar de Southern a membranas de nailon (Duralon, Stratagene, TX, EE.UU.) y después se hibridaron a 1×10^6 dpm/ml de sonda específica de casete de CMV de 600 pb o GPR de 11 kb, tat de 250 pb, Chim3 de 600 pb, y RD114-TR de 500 pb marcada mediante cebado aleatorio con ^{32}P , en tampón de hibridación PerfectHyb PLUS. Tras lavados exhaustivos, las membranas se expusieron a películas de rayos X a -70°C o a PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Análisis mediante PCR analítica

- 30 El amplicón de RRE de 230 pb se obtuvo mediante el uso de 1 ng de vector SIN-eGFP como ADN molde y el grupo de cebadores: RRE-directo: 5'-AGT ACT GGA GCT TTG TTC CTT GGG-3'; RRE-inverso: 5'-AGT ACT AAA TCC CCA GGA GCT G-3' en las condiciones de PCR siguientes: 98°C durante 7 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos.
- 35 El análisis mediante PCR para el cribado de la integración residual del plásmido AAV-Rep78 en las células PK-7 se llevó a cabo con 300 ng de gADNs genómicos mediante el uso del grupo de cebadores: AAV-Rep78 directo: 5'-CGG GCT GCT GGC CCA CCA GG-3'; AAV-Rep78 inverso: 5'-ATG CCG GGG TTT TAC GAG ATT GTG-3' y las condiciones de PCR siguientes: 98°C durante 7 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1,5 minutos.
- 40 Para establecer la orientación de los dos casetes GPR, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR con 300 ng de gADNs mediante el uso del grupo de cebadores: rev directo: 5'-CTT GAG GAG GTC TTC GTC GC-3'; beta-globina inverso: 5'-CCC TGT TAC TTC TCC CCT TCC -3'; rev directo anidado: 5'-TGT CTC CGC TIC TTC CTG CC-3'; beta-globina anidado inverso: 5'-TTA ACC ATA GAA AAG AAG GGG-3' y las condiciones siguientes: 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1,5 minutos.
- 45 ELISA de p24gag
La producción de LV física se midió en los sobrenadantes de cultivo mediante el equipo Alliance HIV-1 p24 Antigen ELISA (Perkin Elmer Life y Analytical Sciences, Inc. Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la suposición de que 1 pg de p24gag corresponde a 1×10^4 partículas físicas.

Análisis de transferencia de Western

- 50 Se prepararon extractos de células completas y nucleares derivados de células PK-7 y proteínas virales derivadas de VLP o LV exentos de células aislados como se describió previamente [23,24]. Las proteínas se fraccionaron por tamaños mediante SDS-PAGE, y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare, Life Sciences, UK Ltd, R.U.). Las membranas se bloquearon en un 5% de leche en polvo descremada, y después se incubaron con el Ab primario adecuado. El suero anti-HIV-1, obtenido de un paciente de SIDA, se usó a una dilución 1:2.000; el suero de conejo anti-RD114-TR [22], que reconoce dos péptidos 15-mer (aa 95-109,
- 55

QNRRLDLLTAEQGG y aa 65-79, SGIVRNKIRTLQEEL) en el ectodominio de la proteína, a una dilución 1:500; el MoAb HIV-1 rev (Rev-6, sc-69730) y el Ab anti-YY1 policlonal de conejo purificado por afinidad (C-20, sc-281) (S. Cruz Biotechnology, Inc., S. Cruz, CA) y el anti-p24gag de ratón (Acris Antibodies, Alemania) a una dilución 1:200, 1:1,000 y 1:500, respectivamente. La unión de los Ab se visualizó mediante el sistema de quimioluminiscencia incrementada ECL (ECL, Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuantificación del número de copias del vector (VCN) mediante PCR TaqMan en tiempo real

El número de copias del vector (VCN) del vector integrado se estableció mediante PCR TaqMan cuantitativa con el uso de un instrumento ABI Prism 7,900 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA) y se analizó mediante el programa informático SDS 2.3 (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2 minutos a 50 °C y 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 15 segundos a 60 °C, con un incremento de 0,1 °C/ciclo para la secuencia objetivo GAG. El gADN se amplificó mediante el uso de los cebadores y sondas siguientes:

Objetivo	Nombre	Secuencia
Chim3	NGFR for	5'- GAC CAC AG TGA TGG GCA GCT-3'
	NGFR-rev exo	5'-GCC TTG TAA GTC ATT GGT CTT AAA CG-3'
	NGFR	FAM 5'-TGA CCC GAG GCA CCA CCG ACA-3' TAMRA
RD114-TR	RD for	5'-AGG TTA CTC CAG ATG TCC AAT TTT AGC-3'
	RD rev	5'-GGG AGT GGG TAT CGC AAG AG-3'
	RD114tr	FAM 5'-CAG AGC CAA CAA TCT T-3' MGB
GAG	NA2 GAG for	5'-ACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT-3'
	NA2 GAG rev	5'-ATC TGG CCT GGT GCA ATA GG-3'
	GAG	FAM 5'-CAT CAA TGA GGA AGC TGC AGA ATG GGA TAG A-3' TAMRA
Tat (LTR de HIV)	HIV for	5'-TACTGACGCTCTCGCACC-3'
	HIV rev	5'-TCTCGACGCAGGACTCG-3'
	HIV	FAM-5'-ATCTCTCTCCTTCTAGCCTC-3' MGB

PCR mediada por ligadura (LM)

El ADN genómico se extrajo de células PK-7 mediante el equipo QIAamp DNA Mini (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante y se digirió con *Bgl*II y *Bam*HI a 37 °C durante la noche. La ligadura de un ligador oligonucleotídico de 76 pb adaptador compatible con los extremos adhesivos 5'-GATC-3' se llevó a cabo en condiciones estándar. La LM-PCR se llevó a cabo mediante el uso del siguiente par de cebadores anidados: la ITR directa: 16s: 5'-GTA GCA TGG CGG GTT AAT CA-3', y 17s/largo anidado: 5'-TTA ACT ACA AGG AAC CCC TAG TGA TGG-3'; los cebadores inversos del ligador: Ligador-1: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3' y Ligador-2 anidado: 5'-AGG GCT CCG CTT AAG GGA C-3'. Las secuencias ligadoras correspondieron a 5'-GAT CGT CCC TTA AGC GGA GCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA CCA GGG AAT TCG CCT CGG GAT ATC ACT CAG CAT AAT G-3'. Se llevaron a cabo dos rondas de LM-PCR mediante el uso de la ADN Polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), y cada una comprendió 30 ciclos (95 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 2 minutos). Los amplicones de la PCR se clonaron mediante el uso del equipo de clonación TOPO® (Invitrogen, Co.), y se seleccionaron las colonias de plásmidos que portaban insertos de aproximadamente 100-200 pb para la secuenciación. Las homologías de secuencia se identificaron mediante una búsqueda en BLAST, NCBI.

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Se obtuvieron cromosomas en metafase tratando células PK-7 con colchicina (10 µg/ml) (Sigma nº C9754) durante 2 horas a 37 °C. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se mantuvieron en disolución hipotónica (KCl 75 mM) durante 6 minutos a temperatura ambiente (TA), se fijaron con 4 lavados de metanol/ácido acético (3:1) y después se extendieron sobre un portaobjetos de vidrio limpio. Las muestras citogenéticas se desnaturalizaron en una disolución de formamida del 70% durante 2 minutos a 72 °C, se deshidrataron mediante lavados consecutivos con etanol frío del 70%, 85%, y 95% y después se secaron al aire. Las sondas específicas se prepararon como sigue: el ADN plasmídico de 13 kb que contenía el casete GPR se marcó mediante el uso del equipo de marcaje de ADN con cebadores aleatorios (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)

con SpectrumOrange™-dUTP (Vysis, Inc., Downers Grove, IL), mientras el ADN cósmido de 30 kb de control que contenía el gen *hox4* humano se marcó mediante el uso del equipo de marcaje de ácido nucleico *FISHBright*™ (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, Países Bajos). La hibridación se llevó a cabo incubando 5 ng/μl de cada sonda en 250 μl de formamida del 50%, SSC 2×, y 10% de sulfato de dextrano y 50 ng/μl de tampón de hibridación de ADN C₀T-1 humano (Invitrogen). Las muestras se revistieron con sondas desnaturalizadas durante 10 minutos a 75 °C, se cubrieron con Parafilm®M, y se incubaron durante la noche a 37 °C en una cámara húmeda. Las muestras se lavaron una vez en SSC 0,4×, pH=7 a 72 °C durante 2 minutos, una vez en SSC 4×, pH=7 que contenía un 0,0025% de Tween-20 durante 30 segundos a TA y dos veces en PBS 1× durante 1 minuto a TA. Se realizó una tinción de contraste en los portaobjetos con 0,02 μg/μl de 49,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma). La visualización y las imágenes fotográficas se tomaron con un microscopio vertical Nikon 80i (Nikon Instruments S.p.A., Italia) mediante el uso de iluminación con filtro verde (FITC) y de espectro naranja (espectro naranja). Las imágenes se procesaron con el programa informático Genikon (Nikon).

Ejemplo II: Generación del primer clon PK-7 intermedio

Para obtener la línea celular de empaquetamiento RD-MolPack para la producción continua de LV de 2ª o 3ª generación, se desarrollaron varios clones intermedios derivados de HEK293T. El primero se denominó PK-7 y se obtuvo mediante la integración estable de los genes gag, pol, y rev de HIV-1 por medio del vector baculo-AAV híbrido recombinante (rhBaculo-AAV-GPR) (Figura 1a, esquema 1). Este sistema de administración aprovecha la actividad integrasa de la proteína AAV-rep78, proporcionada de manera transitoria, para cortar e integrar los casetes de integración flanqueados por ITR de AAV en los cromosomas humanos (Figura 1b). El vector rh-baculo-AAV se generó mediante recombinación homóloga entre el ADN Lineal BaculoDirect y el plásmido de entrada Gateway® pENTR™4 que contenía los casetes GPR flanqueados por ITR (Figura 1a, esquema 1). Después de 3 ciclos (p3) de amplificación con baculovirus recombinante en células de insecto Sf9, se comprobó el título y los sucesos de recombinación potenciales del ADN baculo-AAV híbrido mediante ensayo en placa y transferencia de Southern del ADN genómico viral, respectivamente. El título en p3 correspondió a 6×10^{10} ufp/ml, y el análisis de transferencia de Southern reveló una única banda nítida, lo que demuestra que no hubo sucesos de recombinación durante el proceso de amplificación viral (Figura 5).

A continuación, se definió con cuidado la dosis y el momento de la transfección con plásmido AAV-Rep78 y de la infección con rh-baculo-AAV y las condiciones de clonación de las células HEK293T infectadas (Figura 1c). De hecho, la elección de estas condiciones experimentales resultó ser crítica. Así, después de ensayar un amplio intervalo de condiciones, se estableció finalmente que una única dosis de ADN plasmídico AAV-rep78 transfectado 24 horas antes de la infección rh-baculo-AAV al MOI de 1.000 correspondió al mejor diseño experimental. Además, se observó que la siembra de un total de 5×10^5 células distribuidas en 22 placas Petri de 90 mm, cada placa sembrada a una concentración diferente y añadiendo 100 μg/ml de higromicina después de 4 días de la siembra fue la mejor condición para recoger el número más grande de clones de células. Solamente tres de los 360 clones contados, PK-7, PK-17 y PK-18, expresaron p24Gag por encima del umbral establecido de 100 pg/ml. El análisis de transferencia de Southern de los clones reveló que cada clon contiene dos copias del vector de tamaño correcto (Figura 2a). Para excluir la posible integración de ADN plasmídico AAV-Rep78 residual, se llevó a cabo una PCR específica de rep78 con gADN de PK-7 que no detectó ninguna señal positiva (Figura 5b). Se monitorizó el patrón de expresión de proteínas de HIV-1 expresado a partir del casete GPR mediante transferencia de Western de los tres clones PK, y sus partículas similares a virus (VLP) coincidentes liberadas en el medio. Todas las proteínas virales se procesaron de manera adecuada, tuvieron el tamaño correcto y estuvieron en la proporción relativa correcta (Figura 2b). El clon PK de trabajo futuro se seleccionó calculando en células SupT1 la potencia del LV producido a partir de los tres clones después de co-transfectarlo con el plásmido VSV-G y el vector de transferencia de 3ª generación SIN-eGFP (Tabla 1). Es digno de mención que, aunque el título de LV de HEK293T de control producido mediante transfección transitoria fue 5 veces mayor que el de LV de PK-7 y PK-18, su infectividad fue casi idéntica a la del LV de PK, lo que sugiere que los clones PK generan LV que bajo un punto de vista de la "calidad" son comparables a los producidos mediante los métodos convencionales (Tabla 1). Aunque la potencia de LV de PK-7 y PK-18 fue similar, el clon PK-7 se seleccionó para la manipulación genética posterior porque su morfología, crecimiento, viabilidad y valores de producción de p24Gag fueron mejores que los del clon PK-18 (Tabla 1).

Tabla 1. Potencia de LV pseudotipado con VSV-G producido a partir de clones PK

Clones	Título (TU/ml) ^a
PK-7^b	1.1×10^7
PK-17	5.4×10^6
PK-18	1.0×10^7
HEK-293T	5.8×10^7
p24Gag (ng/ml)	
PK-7	406
PK-17	636
PK-18	326
HEK-293T	1694
Infectividad (TU/ng p24Gag)	
PK-7	2.7×10^4
PK-17	8.4×10^3
PK-18	3.0×10^4

^aEl título se calculó en células SupT1 3 días tras la transducción. Las células se transfectaron con los plásmidos VSV-G y SIN-eGFP.

^bSe indica en negrita el clon seleccionado.

A continuación, se caracterizó a fondo la integración del casete GPR flanqueado por ITR en el clon PK-7 mediante LM-PCR cuantitativa, PCR TaqMan (Figura 2c) y técnicas de FISH (Figura 2d). Para cartografiar exactamente el sitio de integración, se llevaron a cabo estudios de LM-PCR, que destacaron el punto de ruptura en el cromosoma 2, 2q32.1 (Figura 2c). Este resultado se confirmó mediante hibridación in situ con la sonda de GPR específica, que reveló un único punto en el cromosoma 2 respecto de la longitud del brazo y la posición del centrómero (Figura 2d). Para confirmar esta asignación de la localización, se usó la sonda Hox4, que se sabe que se localiza en el cromosoma 2q31.2. Debido a que las células HEK293T son triploides, Hox4 se detectó correctamente en los tres cromosomas 2 (Figura 2d). Por último, se confirmó mediante PCR TaqMan cuantitativa que se integraron dos copias, y mediante PCR anidada con un diseño adecuado de los cebadores (Figura 2e), que las dos copias estuvieron en una orientación de tándem, cola-a-cabeza. La orientación cola-a-cabeza es la configuración natural observada también para la integración de AAV de tipo natural y para la mayor parte de concatámeros de vectores rAAV en el genoma de la célula hospedadora [17]. El análisis de la secuencia del amplicón que abarca la unión cola-a-cabeza reveló que se perdió un fragmento de 910 pb que comprendía 303 pb del promotor CMV de 3' del primer casete junto con ambas ITRs del primer y segundo casete, y el promotor CMV de 5' completo del segundo casete (Figura 2e, caja roja). La mayoría de los sucesos de recombinación vector-célula se dan, de hecho, dentro de las secuencias ITR del vector. Este reordenamiento ha provocado en las células PK-7 la ausencia de transcripción del gen gag-pol del segundo casete y probablemente la ausencia de transcripción de los genes rev e hygro del primer casete. Sin embargo, es digno de mención que la región de 285 pb a la izquierda del promotor CMV deletado (Figura 2e, triángulo gris en el centro del esquema) todavía contiene la caja TATA que podría ser suficiente para controlar la transcripción de los genes rev e hygro. En conclusión, PK-7 contiene dos casetes integrados, que transcriben colectivamente un gen gag-pol y uno o dos genes rev e hygro.

Para demostrar la estabilidad del clon PK-7 a lo largo del tiempo, las células se cultivaron en presencia o ausencia de higromicina durante 350 días, que correspondió a aprox. 420 duplicaciones celulares, y se midió la producción de p24Gag por célula (Tabla 2). La producción media en presencia de higromicina corresponde a $15,34 \pm 8,47$ DE ng de p24Gag/ 1×10^6 células, mientras en ausencia de antibiótico es $6,70 \pm 3,51$ DE ng de p24Gag/ 1×10^6 células (Tabla 2).

Tabla 2. Estabilidad del clon PK-7 con el tiempo

Pase	Higromicina	Sin higromicina
	p24Gag ng/10 ^{6a}	p24Gag ng/10 ^{6a}
P2	10.00	8.10
P6	7.00	4.80
P10	11.40	4.00
P16	5.00	4.80
P20	9.30	5.20
P24	7.20	6.50
P28	9.20	4.40
P32	6.20	8.80
P36	11.00	9.60
P40	18.00	10.00
P44	4.30	8.40
P48	37.50	3.80
P52	7.00	3.20
P56	11.00	6.70
P60	19.00	4.40
P64	22.00	18.70
P68	15.20	8.00
P72	16.50	4.90
P76	17.80	7.60
P80	30.00	11.00
P84	27.00	8.40
P88	23.20	3.50
P92	23.00	7.50
P98	16.70	1.36
P102	19.00	3.85
Media±DE	15.34±8.47	6.70±3.51
Título (TU/ml) ^b		
P60	3.2 × 10 ⁶	2.0 × 10 ⁶
P102	2.7 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁶
p24Gag (ng/ml) ^b		
P60	86	38
P102	80	13
Infectividad (TU/ng p24Gag) ^b		
P60	4.2 × 10 ⁴	5.2 × 10 ⁴
P102	3.3 × 10 ⁴	1.0 × 10 ⁵

^aNivel de p24Gag expresado como ng/1 × 10⁶ células
^bValores de potencia de LV pseudotipado con VSV-G producido tras la transfección de células PK-7 con plásmidos SIN-eGFP y VSV-G y ensayados en células SupT1 3 días tras la transducción

Esta diferencia deriva probablemente del hecho de que la presión con el fármaco higromicina mantiene en un estado "activado" la transcripción del gen de resistencia hyg^r, y por lo tanto también la cromatina. Esto podría favorecer una transcripción superior de los genes gag-pol. Para estudiar si la VLP generada a partir del clon PK-7 fue funcional incluso después de cientos de duplicaciones, las células PK-7 se co-transfectaron en p60 y p102 con la cubierta VSV-G y el vector de transferencia SIN-eGFP, y se calculó la potencia de LV en las células SupT1. Notablemente, el título y la infectividad de LV producido tanto en presencia como en ausencia del fármaco de selección persistieron a un nivel normal incluso después de dicho tiempo prolongado (Tabla 1). Estos datos no muestran una inestabilidad genética del casete GPR independientemente de la presencia o ausencia de presión con fármaco, y permitió evitar el uso de higromicina en la caracterización futura. No existen en la bibliografía datos comparables con respecto a la estabilidad de la integración de un casete mediado por AAV-ITR. La única información relacionada es que una línea celular similar a fibroblastos, derivada de médula ósea humana, (células Detroit 6 de Ruddle) infectada con el serotipo 2 de AAV (AVV-2) de tipo natural mantuvo las secuencias virales en un estado latente durante al menos 47 pases [16,17]. Notablemente, las células PK-7 sobrevivieron durante al menos 102 pases.

Ejemplo III: Desarrollo del segundo intermedio, clon PK-7-Tat7 para RD2-MolPack de 2^a generación

La siguiente etapa hacia el desarrollo de RD-MolPack de 2^a generación (Figura 1c) consistió en la integración estable del factor regulador Tat de HIV-1 en células PK-7 por medio de la administración de SIN-LV (Figura 1, esquema 2). Las células se transdujeron mediante dos ciclos de espinoculación y después se clonaron mediante dilución limitante tras selección con puromicina. Se recogieron 11 clones en crecimiento y, tras un primer cribado basado en la producción de p24gag, se estableció la expresión de Tat mediante transferencia de Western con el uso de extractos nucleares obtenidos de cinco clones que mostraban valores ≥ 5 ng de p24gag/1 × 10⁶ células. Solamente los clones PK-7-Tat5 y PK-7-Tat7 exhibieron un nivel elevado de tat (Figura 3a) y p24gag (Figura 3b). Así, solamente se clonaron adicionalmente estos dos clones estableciendo mediante PCR TaqMan que PK-7-Tat5 contuvo 12 y PK-7-Tat7 seis copias del gen tat; también se midió la potencia de LV co-transfectando el plásmido de la cubierta VSV-G restante y el vector de transferencia pΔN-eGFP de 2^a generación. Aunque el título de ambos clones fue 2 unidades logarítmicas inferior, la infectividad fue solamente 1 unidad logarítmica inferior que las células

de control (Tabla 3). Sobre esta base, se seleccionó PK-7-Tat7 como clon intermedio en el que integrar posteriormente la cubierta RD114-TR.

Tabla 3. Potencia de LV pseudotipado con VSV-G producido a partir de clones PK7-Tat

Clones	Título (TU/ml) ^a
PK-7-Tat5	1.5×10^5
PK-7-Tat7^b	1.6×10^5
PK-7	1.0×10^7
HEK-293T	1.4×10^7
p24Gag (ng/ml)	
PK-7-Tat5	67.5
PK-7-Tat7	48
PK-7	120
HEK-293T	163
Infectividad (TU/ng p24Gag)	
PK-7-Tat5	2.2×10^3
PK-7-Tat7	3.4×10^3
PK-7	8.3×10^4

^aEl título se calculó en células SupT1 3 días tras la transducción. Las células PK-7 se transfectaron con los plásmidos VSV-G y PΔN-eGFP, mientras las células HEK-293T se transfectaron con los plásmidos VSV-G, CMV-GPRT y PΔN-eGFP.

^bSe indica en negrita el clon seleccionado.

5 Ejemplo IV: Construcción del vector SIN-RD114-TR-IN-RRE

Para añadir la cubierta RD114-TR en los clones PK-7 y PK-7-Tat7 mediante la administración de SIN-LV, el primero de numerosos intentos consistió en la construcción del vector SIN-RD114-TR (Figura 1a, esquema 3). Con este propósito, el casete PGK-eGFP del vector SIN-eGFP (Figura 1a, esquema 6) se sustituyó con el casete CMV-RD114-TR, que no contuvo el intrón de β-globina presente en el plásmido CMV-RD114-TR original (Figura 1a, esquema 12). El intrón de β-globina se excluyó inicialmente de la construcción por temor a múltiples sucesos de corte y empalme posibles controlados por el donante de corte y empalme (SD) fuerte localizado en posición 5' de la señal de empaquetamiento del vector SIN no solamente con el aceptor de corte y empalme (SA) localizado en posición 5' del elemento cPPT, sino también con el SA del intrón de β-globina. En este último caso, de hecho, el corte y empalme eliminaría el promotor CMV del ARN genómico del vector (Figura 1, esquema 6). Sorprendentemente, este vector SIN y todos los plásmidos intermedios con la misma configuración de casete de expresión no produjeron proteína RD114-TR. De hecho, cuando los extractos celulares obtenidos a partir de células transfectadas (TF) o transducidas (TD) con el SIN-RD114-TR se analizaron mediante transferencia de Western, el nivel de proteína RD114-TR fue indetectable en comparación con el obtenido a partir del plásmido de control CMV-RD114-TR (Figura 4a, carriles 1-3). El análisis de transferencia de Northern demostró que los transcritos específicos de SIN-RD114-TR generados tras la transfección del plásmido en células PK-7 correspondieron a los transcritos de tamaño completo (FL) y con corte y empalme simple, pero no a los del casete CMV-RD114-TR interno, lo que sugiere la posible necesidad del intrón de β-globina para una acumulación de transcrito RD114-TR eficaz (Figura 6, carriles 1 y 2).

Basándose en estos hallazgos, se sostuvo que la necesidad inesperada del intrón de β-globina para obtener la producción de RD114-TR podría reflejar la presencia de inestabilidad o secuencias negativas en el ORF de RD114-TR. El análisis de secuencia asistido por GeneOptimizer[®] llevado a cabo por GENEART AG (Regensburg, Alemania) determinó qué codones con un mal uso de los codones estuvieron distribuidos por todo el gen RD114-TR, dando razón a la suposición. Además, el análisis de optimización de codones indicó que el índice de adaptación de codones (CAI) mejoró de 0,65 a 0,98 (en donde un CAI de 1 es el óptimo). Por lo tanto, para evitar la necesidad de incluir el intrón de β-globina en el diseño del vector, el ORF de RD114-TR completo se optimizó por medio del servicio de GENEART AG. Se descubrió que la optimización de codones permitió la traducción de PR de RD114-TR aún en ausencia del intrón de β-globina, pero, inesperadamente, el nivel elevado de proteína precursora (PR) no fue procesado por furina en las subunidades SU y TM debidas (Figura 4a, carriles 7). Se descartó la posibilidad de que la acumulación de una gran cantidad de PR sin procesar fuera secundaria a un exceso de sustrato, porque no se documentó ninguna escisión proteolítica incluso después de una cantidad muy baja de transfección de ADN

plasmídico (10 pg ADN/10⁶ células). Por lo tanto, se concluyó que una o más mutación(es) silenciosas podrían haber modificado la velocidad de transcripción/traducción de la proteína comprometiendo, por lo tanto, su plegamiento correcto, y probablemente la accesibilidad para la escisión dependiente de furina.

Así, se generaron otros dos vectores que expresaban RD114-TR de t.n. que contenían el intrón de β -globina, el SIN-RD114-TR-IN y la secuencia SIN-RD114-TR-IN-RRE (Figura 1a, esquema 4 y 5, respectivamente); en este último, se incrustó un RRE extra dentro del intrón de β -globina para protegerlo del corte y empalme. El vector SIN-RD114-TR-IN produjo una gran cantidad de proteína tras la transfección (Figura 4a, carril 6), pero no produjo proteína en las células transducidas con SIN-RD114-TR-IN (Figura 4a, carril 7). Este hallazgo se confirmó mediante el análisis de transferencia de Northern que mostró ARN genómico de tamaño completo indetectable, que se esperaba que migrase más lentamente que el de SIN-RD114-TR debido a la presencia del intrón de β -globina de 800 pb (Figura 6, carriles 3 y 4, Exp. FL, tamaño completo). Al contrario, se produjo una gran cantidad de ARNs con corte y empalme por la acción de la SD y SA del β -intrón (Figura 6, carril 3 y 4).

Notablemente, se observó que el RRE del vector SIN-RD114-TR-IN-RRE fue necesario y suficiente para permitir la expresión de la cubierta en células PK-7 transfectadas y transducidas (Figura 4a, carriles 8 y 9) y en las VLPs respectivas (Figura 4a, carriles 10 y 11). La RD114-TR incorporada en VLP se procesó normalmente, mostrando un nivel elevado de las subunidades trans-membrana TM y TM*; esta última resultó de la escisión de la subunidad TM por la proteasa viral, como demostró Sandrin et al., 2004 [22]. La subunidad SU de RD114-TR, que debería co-migrar con la molécula PR, no se detecta mediante el anti-RD114-TR específico que se usó. A continuación, se generó un vector SIN-RD114-TR-CO-IN-RRE y se ensayó la producción y el procesamiento de proteínas. Sin embargo, ninguna proteína producida a partir de este vector se produjo y se procesó de manera adecuada (Figura 4a, carril 13). Este resultado conduce a concluir que la única construcción disponible para la producción correcta de RD114-TR es SIN-RD114-TR-IN-RRE.

Ejemplo V: Desarrollo del clon PK-7-Tat7-RD19 para obtener RD2-MolPack y del clon PK-7-RD32 para obtener RD3-MolPack

Basándose en los resultados presentados hasta ahora, la cubierta RD114-TR se integró de manera estable en los clones PK-7-Tat7 y PK-7 mediante administración de LV SIN-RD114-TR-IN-RRE pseudotipado con VSV-G. Se espinocularon células PK-7-Tat7 y se clonaron mediante dilución limitante. A continuación, se cribaron nueve clones calculando el título de LV producido tras la transducción del vector de transferencia P Δ N-eGFP de 2^a generación (Tabla 4); el nivel de RD114-TR se controló mediante transferencia de Western, y el número de copias integradas mediante PCR TaqMan solamente en los clones que mostraron un título $\geq 1 \times 10^5$ TU/ml, es decir, los clones PK-7-Tat7-RD3, PK-7-Tat7-RD12, y PK-7-Tat7-RD19 (Figura 4b). El clon PK-7-Tat7-RD19 se eligió porque produjo el título más alto y una buena cantidad de RD114-TR con respecto al número de copias integradas de LV SIN-RD114-TR-IN-RRE (Figura 4b, números entre paréntesis).

Tabla 4. Potencia de LV producido a partir de clones PK-7-Tat7-RD

Clones	Título (TU/ml) ^a
PK-7-Tat7-RD3	1.0×10^5
PK-7-Tat7-RD12	1.4×10^5
PK-7-Tat7-RD19	3.0×10^5
PK-7	2.4×10^1
HEK-293T	1.5×10^3
p24Gag (ng/ml)	
PK-7-Tat7-RD3	56
PK-7-Tat7-RD12	121
PK-7-Tat7-RD19	10
PK-7	99
HEK-293T	122
Infectividad (TU/ng p24Gag)	
PK-7-Tat7-RD3	1.7×10^3
PK-7-Tat7-RD12	1.1×10^3
PK-7-Tat7-RD19	3.0×10^4
PK-7	2.4×10^2
HEK-293T	0.1×10^2

^aTítulo de los LVs producidos tras la transducción de clones PK-7-Tat7-RD con el vector P Δ N-eGFP.

Las células PK-7 se transfectaron con los plásmidos CMV-RD114-TR y P Δ N-eGFP, mientras las células HEK-293T se transfectaron con los plásmidos CMV-RD114-TR, CMV-GPRT y P Δ N-eGFP.

A continuación, los mismos protocolos de transducción, selección, clonación y cribado adoptados para generar los clones PK-7-Tat7-RD, se siguieron también para integrar RD114-TR en células PK-7 (Tabla 5). Las células PK-7-RD-26, PK-7-RD-28 y PK-7-RD-32 elegidas se ensayaron mediante transferencia de Western y técnicas de PCR TaqMan (Figura 4c). Se optó por el clon PK-7-RD26 porque, a pesar del hecho de que produce LV con un título bajo, produce el nivel más alto de p24gag en comparación con los otros clones seleccionados, e incluso con el clon PK-7 progenitor (Tabla 7).

Tabla 5. Potencia de LV producido a partir de clones seleccionados PK-7-RD

	SupT1	CD34 ⁺
Clones	Título (TU/ml) ^a	
PK-7-RD26	7.5 × 10 ⁴	2.0 × 10 ⁵
PK-7-RD28	1.4 × 10 ⁴	1.0 × 10 ⁵
PK-7-RD32	2.7 × 10 ⁴	1.7 × 10 ⁵
PK-7	3.3 × 10 ⁴	3.6 × 10 ³
HEK-293T	1.2 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁵
	p24Gag (ng/ml)	
PK-7-RD26	127	
PK-7-RD28	34	
PK-7-RD32	53	
PK-7	38	
HEK-293T	135	
	Infectividad (TU/ng p24Gag)	
PK-7-RD26	6.0 × 10 ²	1.5 × 10 ³
PK-7-RD28	4.0 × 10 ²	2.9 × 10 ³
PK-7-RD32	5.0 × 10 ²	3.0 × 10 ³
PK-7	8.7 × 10 ²	1.0 × 10 ²

^aTítulo de los LVs producidos tras la transfección de clones PK-7-RD con el plásmido SIN-GFP, del clon PK-7 con los plásmidos SIN-GFP y RD114 y de HEK-293T con CMV-GPR, SIN-GFP y RD114-TR, respectivamente.

De manera interesante, el nivel de subunidad TM de RD114-TR fue equivalente en los clones PK-7-RD28 y PK-7-RD32 frente a una diferencia notoria en el número de copias de RD114-TR entre los dos (Figura 4c, números entre paréntesis), lo que sugiere que parte de los vectores SIN-RD114-TR-IN-RRE no deben ser funcionales en el clon PK-7-RD32. Así, para combinar el nivel elevado de producción de p24gag y un nivel posiblemente mayor de proteína RD114-TR en el clon PK-7-RD26, se llevaron a cabo otros dos ciclos de integración de SIN-RD114-TR-IN-RRE, selección y clonación obteniendo del primer ciclo el subclon PK-7-RD26.72, y del segundo ciclo el subclon RD26.72.10, incrementando el número de copias de RD114-TR de 2 a 11 y después 22, y el título de 7.0×10^2 a $1,1 \times 10^4$ y finalmente hasta $2,7 \times 10^5$, respectivamente (Figura 4d, números entre paréntesis).

Ejemplo VI: Desarrollo de la línea celular productora estable RD-MolPack-Chim3 de 2^a generación

Para obtener las células de empaquetamiento RD-MolPack de 2^a generación finales, se integró en las células PK-7-Tat7-RD19 el vector de transferencia PΔN-Chim3 (Figura 1a, esquema 7), cuyo gen terapéutico Chim3 se ha caracterizado exhaustivamente en el contexto de la terapia génica anti-HIV/SIDA [23,24]. Tras el protocolo de cribado estandarizado, se eligieron los tres clones PK-7-Tat7-RD19-Chim3.2, PK-7-Tat7-RD19-Chim3.3 y PK-7-Tat7-RD19-Chim3.14 (Tabla 6) para su caracterización adicional.

Tabla 6. Potencia de LV producido a partir de clones RD2-MolPack-Chim3

Clones	SupT1	CD34
	Título (TU/ml)	
RD2-MolPack-Chim3.2	2.6×10^5	1.1×10^5
RD2-MolPack-Chim3.3	3.9×10^5	2.6×10^5
RD2-MolPack-Chim3.14^a	$0.3-1 \times 10^6$	5.1×10^5
PK-7 ^b	1.3×10^5	1.5×10^5
HEK-293T ^c	6.5×10^3	5.1×10^3
p24Gag (ng/ml)		
RD2-MolPack-Chim3.2 ^b	74	112
RD2-MolPack-Chim3.3	40	120
RD2-MolPack-Chim3.14^b	127	101
PK-7	102	88
HEK-293T	437	493
Infectividad (TU/ng p24Gag)		
RD2-MolPack-Chim3.2 ^b	3.5×10^3	9.0×10^2
RD2-MolPack-Chim3.3	9.0×10^3	2.2×10^3
RD2-MolPack-Chim3.14^b	$5.2-8 \times 10^3$	5.0×10^3
PK-7	1.6×10^2	1.7×10^3

^aSe indica en negrita el clon seleccionado.

^bSe produjeron LV tras la transfección de células PK-7 con el vector de transferencia PΔN-Chim3 y el plásmido de la cubierta RD114-TR.

^cSe produjeron LV tras la transfección de células HEK-293T con el vector de transferencia CMV-GPR, PΔN-Chim3 y el plásmido de la cubierta RD114-TR. Se ensayaron los LV en las células objetivo 3 días tras la transducción

Se seleccionó el clon PK-7-Tat7-RD19-Chim3.14 (en adelante RD2-MolPack-Chim3.14) porque crece espontáneamente en suspensión. Se verificó que el clon sobrevive en cultivo durante casi dos meses generando 3 TU/célula/día cuando el título se determinó en células SupT1. Además, las células RD2-MolPack-Chim3.14 pueden sobrevivir normalmente en medio DMEM que contiene un 5% de FCS, mientras su viabilidad disminuye cuando se adaptan al crecimiento en medio DMEM que contiene un 2,5% de FCS (Figura 3d). Sus características de crecimiento son importantes para el cultivo potencial a gran escala en un biorreactor. También se verificó que, a pesar del número de copias elevado del Chim3-LV integrado, no se observó ningún reordenamiento de los genes virales por medio del análisis de transferencia de Southern, lo que prueba la estabilidad genética de los vectores integrados (Figura 3c). Sorprendentemente, el título del LV producido a partir del clon RD2-MolPack-Chim3.14 es mayor que el del LV producido a partir de células de control HEK293T y PK-7 transfectadas de manera transitoria con los plásmidos restantes cuando se calcula en células SupT1 o CD34⁺ (Tabla 6).

Referencias

1. Schambach, A., y Baum, C. (2008). Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. *Curr Gene Ther* 8: 474-482.
- 5 2. Carroll, R., Lin, J. T., Dacquel, E. J., Mosca, J. D., Burke, D. S., y St Louis, D. C. (1994). A human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based retroviral vector system utilizing stable HIV-1 packaging cell lines. *J Virol* 68: 6047-6051.
3. Yu, H., Rabson, A. B., Kaul, M., Ron, Y., y Dougherty, J. P. (1996). Inducible human immunodeficiency virus type 1 packaging cell lines. *J Virol* 70: 4530-4537.
- 10 4. Poeschla, E., Corbeau, P., y Wong-Staal, F. (1996). Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11395-11399.
5. Corbeau, P., Kraus, G., y Wong-Staal, F. (1996). Efficient gene transfer by a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived vector utilizing a stable HIV packaging cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 14070-14075.
6. Throm, R. E., et al. (2009). Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection. *Blood* 113: 5104-5110.
- 15 7. Broussau, S., et al. (2008). Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture. *Mol Ther* 16: 500-507.
8. Srinivasakumar, N., Chazal, N., Helga-Maria, C., Prasad, S., Hammarskjold, M. L., y Rekosh, D. (1997). The effect of viral regulatory protein expression on gene delivery by human immunodeficiency virus type 1 vectors produced in stable packaging cell lines. *J Virol* 71: 5841-5848.
- 20 9. Kaul, M., Yu, H., Ron, Y., y Dougherty, J. P. (1998). Regulated lentiviral packaging cell line devoid of most viral cis-acting sequences. *Virology* 249: 167-174.
10. Cockrell, A. S., Ma, H., Fu, K., McCown, T. J., y Kafri, T. (2006). A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors. *Mol Ther* 14: 276-284.
11. Bestor, T. H. (2000). Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest* 105: 409-411.
- 25 12. Ikeda, Y., Takeuchi, Y., Martin, F., Cosset, F. L., Mitrophanous, K., y Collins, M. (2003). Continuous high-titer HIV-1 vector production. *Nat Biotechnol* 21: 569-572.
13. Palombo, F., Monciotti, A., Recchia, A., Cortese, R., Ciliberto, G., y La Monica, N. (1998). Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-adenovirus-associated virus vector. *J. Virol.* 72: 5025-5034.
14. Smith, R. H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15: 817-822.
- 30 15. Sandrin, V., et al. (2002). Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 100: 823-832.
16. Berns, K. I., y Linden, R. M. (1975). The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* 17: 237-245.
- 35 17. Cheung, A. K., Hoggan, M. D., Hauswirth, W. W., y Berns, K. I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 33: 739-748.
18. Samulski, R. J., Chang, L. S., y Shenk, T. (1987). A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication. *J Virol* 61: 3096-3101.
19. Recchia, A., Perani, L., Sartori, D., Olgiati, C., y Mavilio, F. (2004). Site-specific integration of functional transgenes into the human genome by adeno/AAV hybrid vectors. *Mol Ther* 10: 660-670.
- 40 20. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., y Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15: 871-875.
21. Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M., y Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25: 217-222.
- 45 22. Sandrin, V., Muriaux, D., Darlix, J. L., y Cosset, F. L. (2004). Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. *J Virol* 78: 7153-7164.
23. Porcellini, S., et al. (2009). The F12-Vif derivative Chim3 inhibits HIV-1 replication in CD4+ T lymphocytes and CD34+-derived macrophages by blocking HIV-1 DNA integration. *Blood* 113: 3443-3452.

24. Porcellini, S., Gubinelli, F., Alberici, L., Piovani, B. M., Rizzardi, G. P., y Bovolenta, C. (2010). Chim3 confers survival advantage to CD4+ T cells upon HIV-1 infection by preventing HIV-1 DNA integration and HIV-1-induced G2 cell-cycle delay. *Blood* 115: 4021-4029.
- 5 25. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., y Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15: 871-875.
26. Di Nunzio, F., Piovani, B., Cosset, F. L., Mavilio, F., y Stornaiuolo, A. (2007). Transduction of human hematopoietic stem cells by lentiviral vectors pseudotyped with the RD114-TR chimeric envelope glycoprotein. *Hum Gene Ther* 18: 811-820.
- 10 27. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 1998; 72: 8463-71

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable que comprende:

- i. preparar un vector híbrido (A) que comprende un esqueleto baculoviral que contiene un casete de integración flanqueado por ITR de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral, y un marcador de selección con antibiótico y
- ii. preparar un plásmido de expresión (B) que contiene un marco de lectura abierto de rep de AAV bajo el control de un promotor
- iii. transfectar las células con el plásmido de expresión B y posteriormente infectar las células con el vector híbrido A
- iv. cultivar las células en presencia de antibiótico para la selección
- v. obtener células que expresan de manera estable las proteínas gag, pol y rev
- vi. integrar un gen env en las células mediante el uso de un vector de expresión
- vii. cultivar las células para obtener una línea celular que expresa de manera estable las proteínas gag, pol, rev y env

2. Un método para obtener una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable que comprende:

- i. preparar un vector híbrido (A) que comprende un esqueleto baculoviral que contiene un casete de integración flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITRs) de virus adeno-asociado (AAV) que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral y un marcador de selección con antibiótico, y
- ii. preparar un plásmido de expresión (B) que contiene el ORF de rep de AAV bajo el control de un promotor
- iii. transfectar las células con el plásmido de expresión B y posteriormente infectar la célula con el vector híbrido A
- iv. cultivar las células en presencia de antibiótico para la selección
- v. obtener células que expresan de manera estable las proteínas gag, pol y rev
- vi. integrar un gen tat lentiviral en tales células mediante el uso de un vector de expresión
- vii. cultivar las células para obtener una línea celular que expresa de manera estable las proteínas gag, pol, rev y tat
- viii. integrar un gen env en tales células mediante el uso de un vector de expresión
- ix. cultivar las células para obtener una línea celular que expresa de manera estable la proteína gag, pol, rev, tat y env

3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que los dos casetes de expresión del vector híbrido están orientados cola a cola y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A

4. Un método según la reivindicación 3, en el que el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV, y RSV

5. Un método según la reivindicación 4, en el que el promotor es CMV IE

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el marcador de selección se selecciona de los genes de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina o zeomicina.

7. Un método según la reivindicación 6, en el que el marcador de selección es el gen de resistencia a higromicina.

8. Un método según la reivindicación 1 ó 7, en el que el marcador de selección se clona en posición 3' respecto de un IRES.

9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteína Rep de AAV es Rep78.

10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el gen env se selecciona de env de MLV 4070, env de RD114, proteína de la cubierta quimérica RD114-TR, proteína de la cubierta quimérica RD114-pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos.

11. Un método según la reivindicación 10, en el que el gen env es el gen que codifica la proteína de la cubierta química RD114-TR
12. Un método según la reivindicación 11, en el que la RD114-TR se integra mediante el uso de un vector lentiviral SIN que comprende un casete de expresión que contiene del extremo 5' al 3' un promotor CMV, el intrón de β -globina que contiene un elemento RRE en su secuencia y el ORF de RD114-TR.
13. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable que contiene integrado de manera estable en su genoma:
 - i. al menos una copia de un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral y un marcador de selección
 - ii. al menos una copia de un gen env
14. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según la reivindicación 13, en la que la célula contiene además el gen tat de HIV-1 integrado de manera estable en su genoma.
15. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según la reivindicación 13 ó 14, en la que la célula es una línea celular humana seleccionada de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa.
16. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que los dos casetes de expresión del casete de integración están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A
17. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV, y RSV
18. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en la que el marcador de selección se selecciona de los genes de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina o zeomicina.
19. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en la que el gen env se selecciona de env de MLV 4070, env de RD114, proteína de la cubierta química RD114-TR, proteína de la cubierta química RD114-pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos.
20. Una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en la que el gen env es el gen que codifica la proteína de la cubierta química RD114-TR
21. Un método para producir vectores lentivirales que comprende:
 - i. Cultivar una línea celular de empaquetamiento lentiviral estable según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20
 - ii. Insertar en la línea celular de empaquetamiento estable un vector de transferencia
22. Una línea celular productora que contiene integrado de manera estable en su genoma:
 - i. al menos una copia de un casete de integración flanqueado por ITRs de AAV que incluye dos casetes de expresión, en el que el primer casete de expresión codifica los genes gag y pol lentivirales y el segundo rev lentiviral y un marcador de selección
 - ii. al menos una copia de un env
 - iii. un vector de transferencia
23. Una línea celular productora según la reivindicación 22, en la que la célula contiene además al menos una copia de un gen tat lentiviral integrado de manera estable en su genoma.
24. Una línea celular productora según la reivindicación 22 ó 23, en la que la célula es una línea celular humana seleccionada de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa.
25. Una línea celular productora según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en la que los dos casetes de expresión del vector híbrido están orientados cola-a-cola, y cada uno está controlado por un promotor constitutivo y porta una poli A
26. Una línea celular productora según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en la que el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV, y RSV.

27. Una línea celular productora según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en la que el marcador de selección se selecciona de los genes de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina o zeomicina.

5 28. Una línea celular productora según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, en la que el gen env se selecciona de env de MLV 4070, env de RD114, proteína de la cubierta quimérica RD114-TR, proteína de la cubierta quimérica RD114-pro, env de baculovirus GP64 o env de GALV o derivados de los mismos.

29. Una línea celular productora según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, en la que el gen env es el gen que codifica la proteína de la cubierta quimérica RD114-TR.

30. Un método para producir vectores lentivirales que comprende:

i. cultivar una línea celular productora según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29

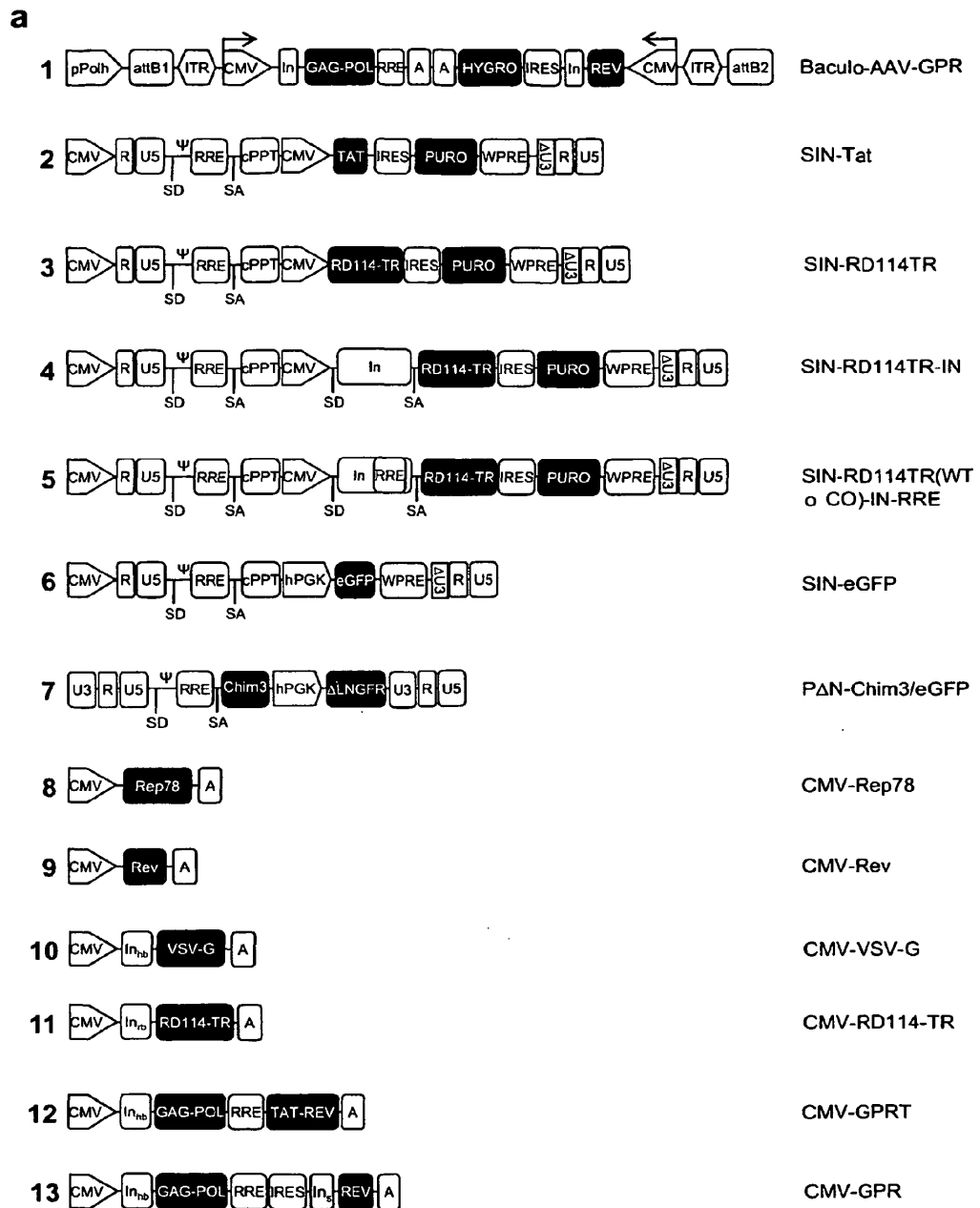


Figura 1

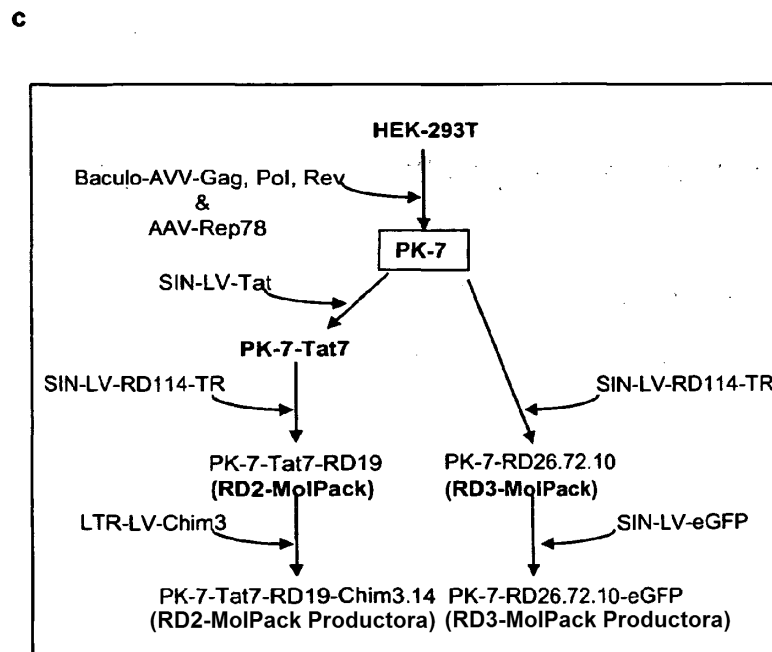
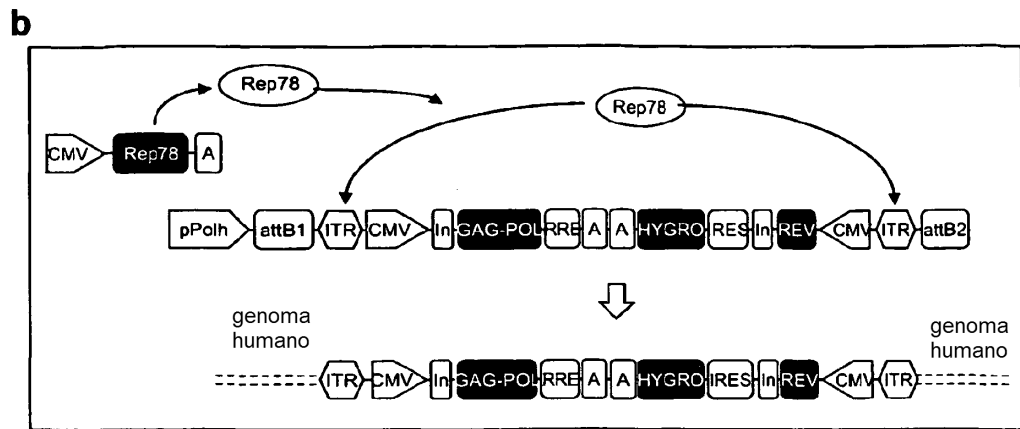


Figura 1

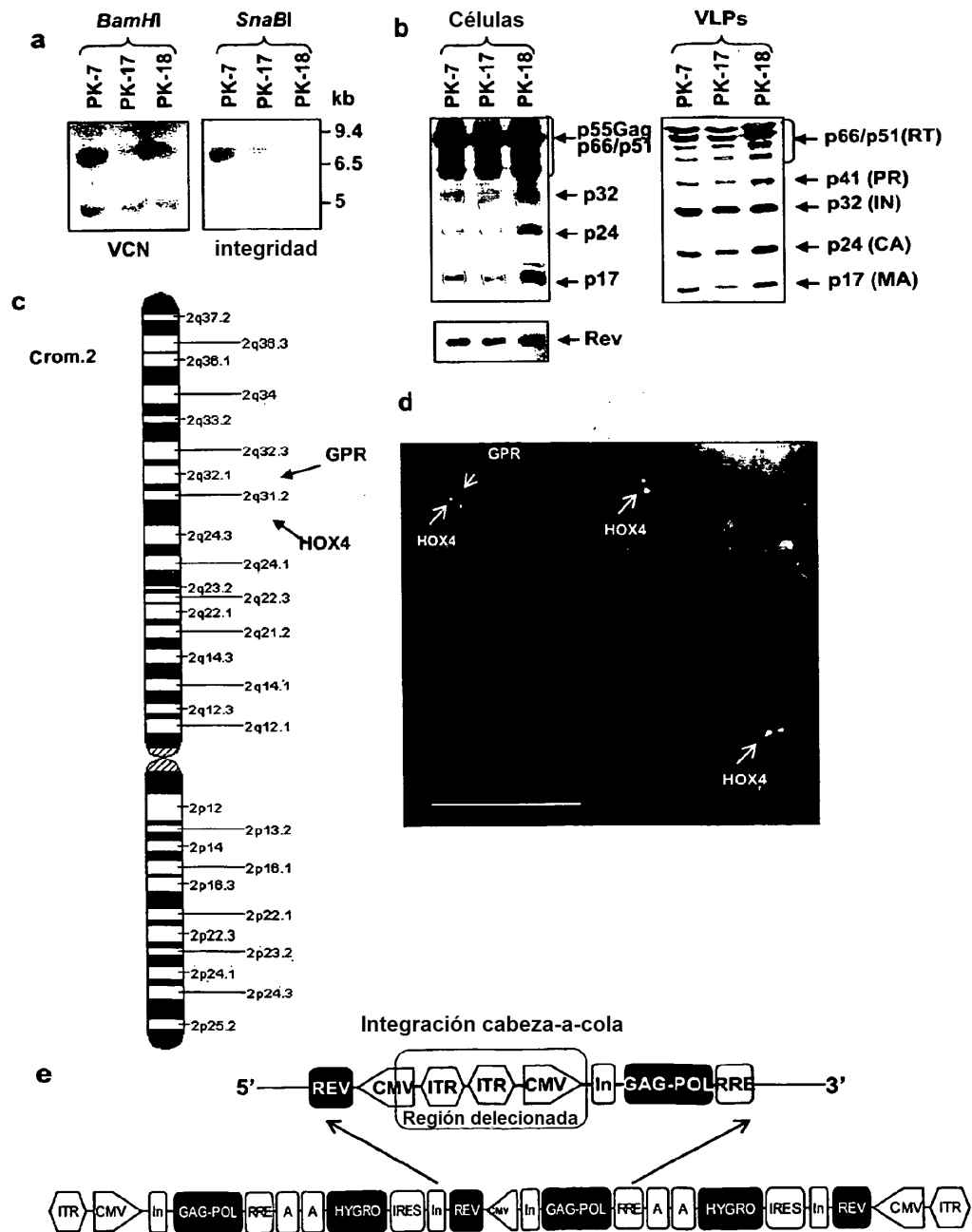


Figura 2

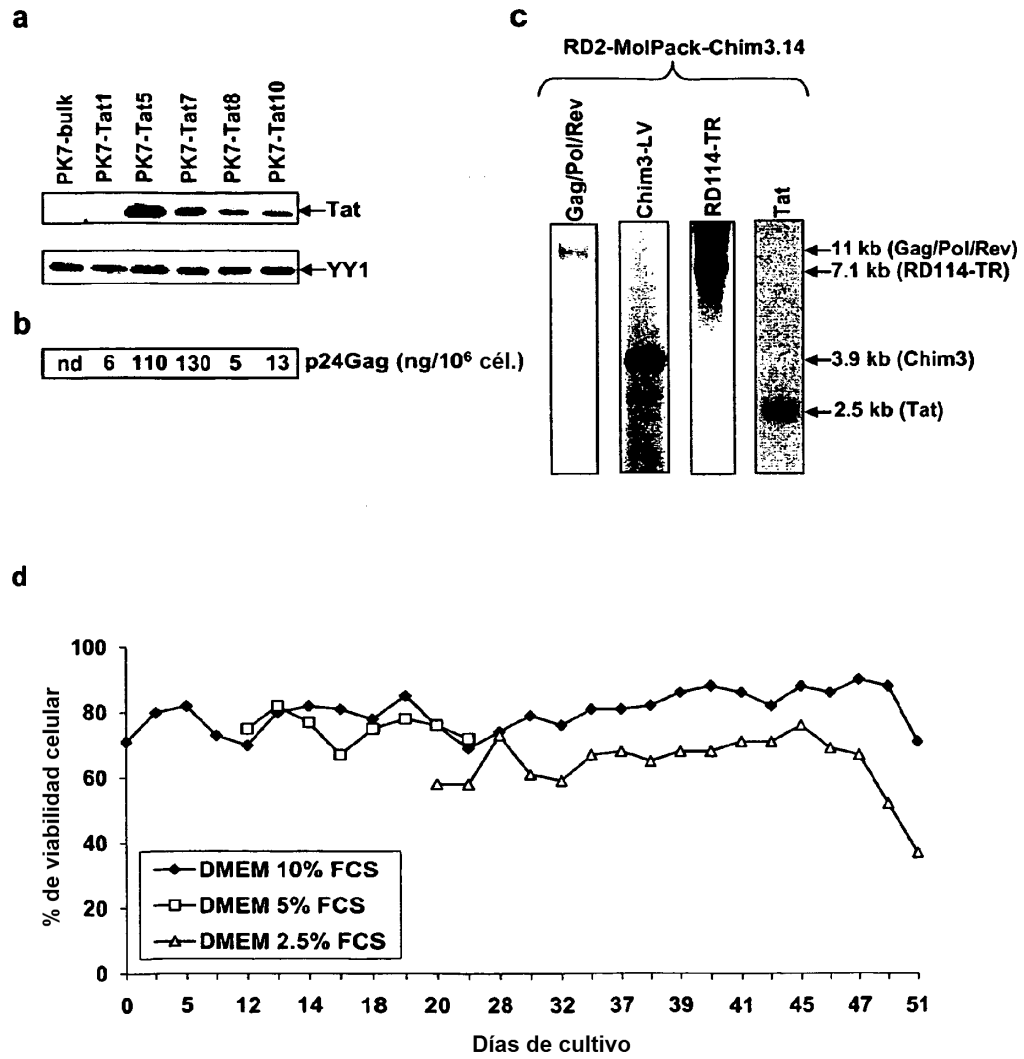


Figura 3

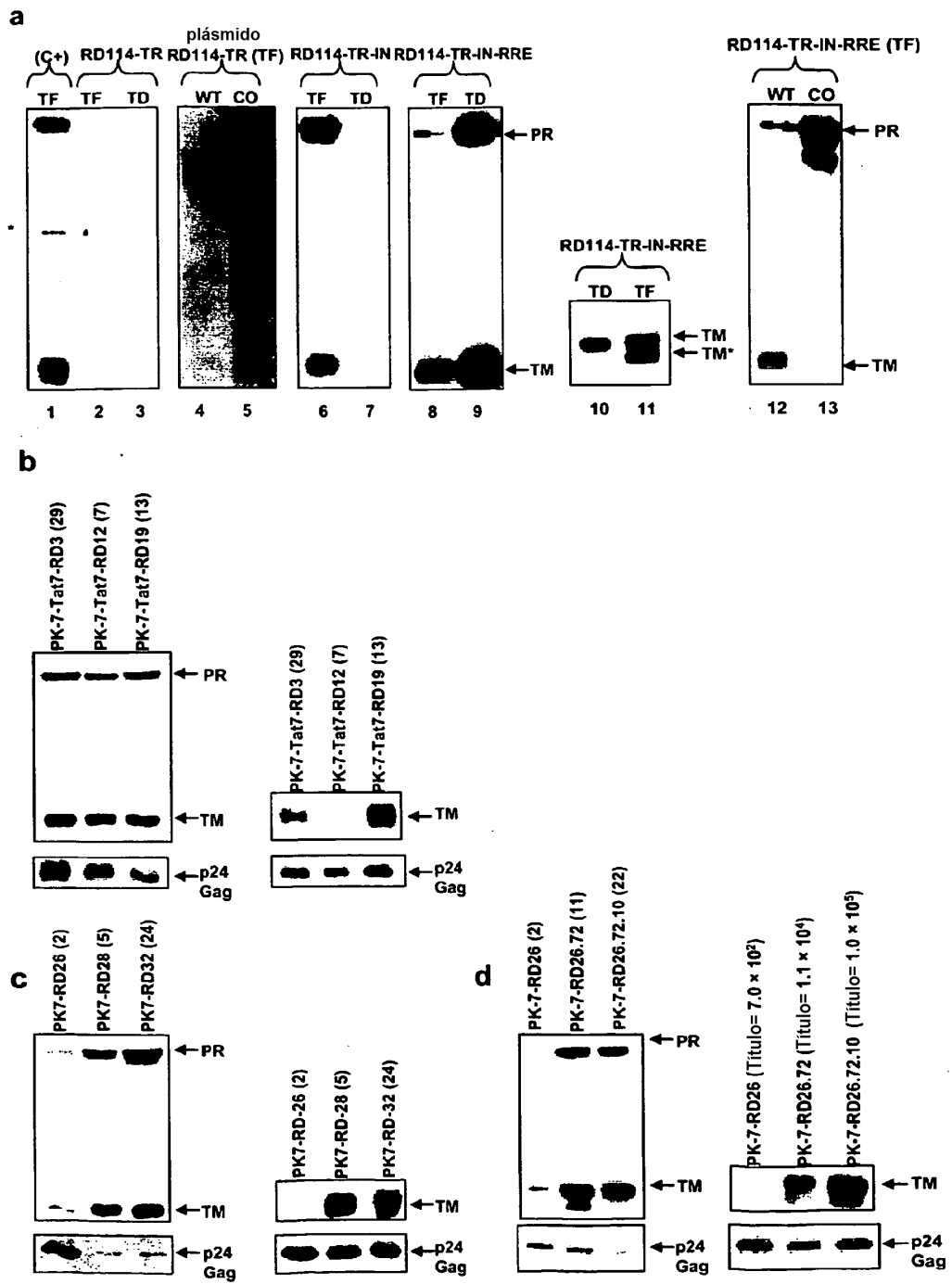


Figura 4

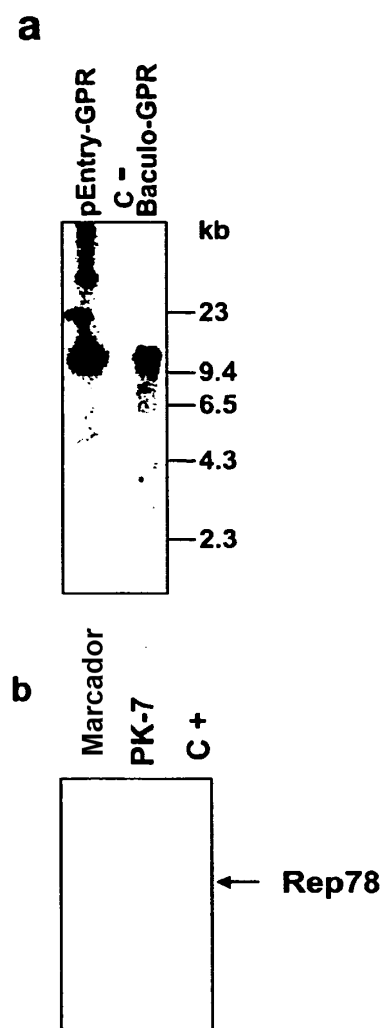


Figura 5

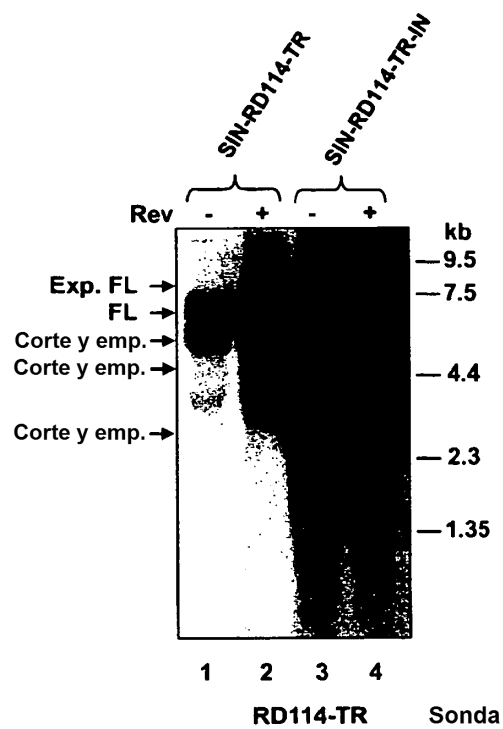


Figura 6