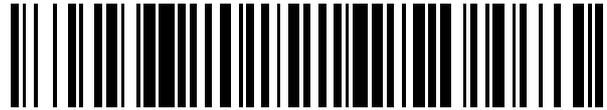


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 520 024**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2007 E 07818467 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2066795**

54 Título: **Pseudotipificación de vectores retrovíricos, métodos para su producción y su uso para la transferencia de genes dirigida y la selección de alta capacidad de procesamiento**

30 Prioridad:

27.09.2006 EP 06020257

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

11.11.2014

73 Titular/es:

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND,
LETZTVERTRETEN DURCH DEN PRÄSIDENTEN
DES PAUL-EHRLICH-INSTITUTS (100.0%)
Prof. Dr. Klaus Cichutek, Paul Ehrlich-Strasse 51-
59
63225 Langen, DE**

72 Inventor/es:

**BUCHHOLZ, CHRISTIAN;
KNEISL, SABRINA;
CICHUTEK, KLAUS y
CATTANEO, ROBERTO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 520 024 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

Pseudotipificación de vectores retrovéricos, métodos para su producción y su uso para la transferencia de genes dirigida y la selección de alta capacidad de procesamiento

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a la pseudotipificación de vectores retrovéricos con proteínas de la envuelta heterólogas derivadas de la familia *Paramyxoviridae*, género *Morbillivirus*, y a diversos usos de las partículas de vector resultantes.

Antecedentes de la invención

- 10 Comparados con otros sistemas de transferencia de genes, los vectores retrovéricos ofrecen una amplia gama de ventajas, que incluyen su capacidad para transducir una diversidad de tipos celulares, integrar de modo estable el material genético transferido en el genoma de la célula hospedante diana, y expresar el gen transducido a niveles significativos. Por tanto, los vectores derivados de los gamma-retrovirus, por ejemplo, el virus de la leucemia murina (MLV), se han convertido en una herramienta convencional para la tecnología de la transferencia de genes y se han empleado con frecuencia en ensayos de terapia génica clínicos (Ross *et al.*, Hum. Gen Ther., 7:1781-1790, 1996).
15 Además, también se ha descrito previamente el uso de estos vectores para el tratamiento de diferentes inmunodeficiencias monogénicas.

- La pseudotipificación de vectores retrovéricos, que incluyen vectores de VIH o vectores de MLV, se refiere a la incorporación de proteínas de la envuelta de virus heterólogos en la membrana de la envuelta retrovérica. Estos vectores retrovéricos pseudotipificados entonces muestran un fenotipo de receptor similar al virus del cual se deriva la proteína de la envuelta. Dependiendo de la gama de hospedantes de dicho virus, los vectores retrovéricos pseudotipificados tendrán entonces una gama de hospedantes más amplia o más estrecha, comparado con las partículas de vectores que tienen las proteínas de la envuelta retrovéricas homólogas incorporadas.
20

- Se han descrito una serie de vectores pseudotipificados, que incluyen vectores de MLV pseudotipificados con la proteína Env de VIH, la glicoproteína del virus de Ébola, o la glicoproteína de baculovirus. En todos estos vectores conocidos se empleó una única proteína de la envuelta para lograr la pseudotipificación deseada.
25

- El virus del sarampión (MeV), un morbillivirus prototípico del género *Paramyxoviridae*, utiliza dos glicoproteínas de la envuelta (la proteína de fusión (F) y la proteína de hemaglutinina (H)) para conseguir entrar en la célula diana. La proteína F es un tipo de proteína transmembrana I, mientras que la proteína H es un dominio transmembrana de tipo II, es decir su amino terminal está expuesto directamente a la región citoplásmica. Así, ambas proteínas comprenden una región transmembrana y una región citoplásmica. Una función conocida de la proteína F es la mediación en la fusión de membranas víricas con las membranas celulares de la célula hospedante. Las funciones atribuidas a la proteína H incluyen el reconocimiento del receptor sobre la membrana diana y el apoyo a la proteína F en su función de fusión a la membrana. La fusión a la membrana directa y muy eficaz en la superficie de la membrana celular es una propiedad particular del virus del sarampión y los morbillivirus, que los distingue de muchos otros virus con envuelta que son endocitados y que solo se fusionan tras la disminución en el pH que se produce con la endocitosis. Ambas proteínas están organizadas sobre la superficie vírica en una disposición regular de picos muy cercanos entre sí, tetrámeros de H y trímeros de F (Russell *et al.*, Virology, 199:160-168, 1994).
30
35

- La cepa Edmonton de MeV (MeV_{Edm}) emplea una única proteína como su receptor principal, concretamente, la proteína conocida por ser la reguladora del factor de activación del complemento, CD46 (Gerlier *et al.*, Trends Microbiol., 3:338-345, 1995). La CD46 se expresa sobre todas las células humanas nucleadas. Sin embargo, la mayoría de los aislados clínicos del virus del sarampión no pueden utilizar la CD46 como receptor con eficacia. La SLAM humana (molécula de activación de linfocitos de señalización, también denominada CDw150) es una glicoproteína de membrana descubierta recientemente que se expresa sobre algunas células T y B, y también se ha descubierto que actúa como receptor celular para MeV, incluyendo la cepa Edmonton (Tatsuo *et al.*, Nature, 406(6798):893-897, 2000).
40
45

- El documento EP 1 291 419 A1 describe un vector retrovérico que contiene una proteína de membrana que tiene actividad hemaglutinina. El vector vírico es útil para la transferencia de genes hacia las células hospedantes. El documento EP 1 548 101 A1 describe métodos para producir un vector vírico que comprende una proteína de membrana que se une al ácido siálico como componente de la envuelta, que emplea neuraminidasa (NA) derivada de bacterias Gram-positivas. El vector vírico puede utilizarse para trasladar genes hacia células y se ha sugerido para la terapia génica. Aunque los documentos EP 1 291 419 A1 y EP 1 548 101 A1 describen proteínas H y F de longitud completa, estos documentos no mencionan las proteínas H y F truncadas.
50

- Las funciones biológicas e interacciones precisas de las proteínas H y F de MeV siguen sin estar claras en gran medida. Sin embargo, en experimentos en los que se incorporan proteínas H y F truncadas en partículas de vector de MeV producidas de modo recombinante (rMeV) (Möll *et al.*, J. Virol., 76:7174-7186, 2002) se concluyó que el rMeV que contiene la proteína F truncada no presenta diferencias con el MeV de tipo salvaje (wt MeV) con respecto a la inducción de la formación del sincitio o a la producción de virus infecciosos. Sin embargo, el rMeV que contiene
55

la proteína H truncada muestra una inducción gravemente reducida de la formación del sincitio y una disminución en la producción de virus infecciosos. Así, el truncamiento de las proteínas F y H produce, de manera diferencial, una disminución en las titulaciones o no produce ningún efecto en absoluto.

5 A la vista de la importancia de los vectores retrovéricos pseudotipificados para numerosas aplicaciones clínicas y de la tecnología de transferencia de genes, siguen siendo necesarios otros vectores retrovéricos pseudotipificados mejorados y métodos para generar y utilizar dichos vectores.

Sumario de la invención

10 La presente invención se basa en el inesperado descubrimiento de que la utilización de una combinación de proteínas H y F de morbillivirus truncadas para generar las partículas de vector lentivírico pseudotipificado produce un aumento significativo en las titulaciones y en la eficacia de la transducción de las partículas de vector vírico resultantes. Además, y de modo inesperado, una cantidad mayor de proteína F truncada, en comparación con la proteína H truncada, dentro de las partículas de vector lentivírico generadas, conduce a una mayor titulación y una mayor eficacia de la transducción de dichas partículas de vector lentivírico.

15 La invención puede definirse mediante las reivindicaciones adjuntas. Se describe una partícula de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una proteína de fusión (F) y de hemaglutinina (H) de un morbillivirus, en la que las porciones citoplásmicas de dichas proteínas F y H están truncadas, y en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos un resto aminoácido de carga positiva, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir una pseudotipificación eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión.

20 En una realización, la invención se dirige a una partícula de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una proteína de fusión (F) y de hemaglutinina (H) de un morbillivirus, en la que las porciones citoplásmicas de dichas proteínas F y H están truncadas por la delección de restos aminoácidos de dichas porciones citoplásmicas, y en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos 1 resto aminoácido de carga positiva y no más de 9 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo N-terminal de la porción citoplásmica de la proteína F, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir una pseudotipificación eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión, en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína H comprende al menos 9 y no más de 19 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo C-terminal de la porción citoplásmica de la proteína H más una metionina adicional en el N-terminal.

30 En otra realización, la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la invención comprende una proteína H truncada que es una proteína quimérica que no interacciona con CD46 o SLAM, y que también tiene un anticuerpo monocatenario, un factor del crecimiento o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio.

35 En otra realización, la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la invención comprende una cantidad de proteína F truncada que es mayor que la cantidad de proteína H truncada presente en dicha partícula de vector lentivírico pseudotipificado. Preferiblemente, la cantidad de proteína F truncada es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500% mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, es más del 1000% mayor, y aún más preferiblemente es 700% mayor que la cantidad de la proteína H truncada.

En otra realización, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende las partículas de vector lentivírico de la invención.

40 En otra realización, la invención se dirige al uso de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la presente invención para la preparación de un medicamento. Otra realización de la invención es el uso de las partículas lentivíricas pseudotipificadas de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de al menos un trastorno en un sujeto, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una infección crónica, la inmunodeficiencia SCID-X1, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, VIH, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes, una enfermedad neuroinflamatoria, una enfermedad reumática, una enfermedad autoinmunitaria, adipositis, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide, carcinoma renal.

Otra realización de la invención es una molécula de ácido nucleico definida por la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico está formada por un plásmido o un plásmido de expresión.

50 En otra realización, la invención se dirige a un método para producir una partícula de vector lentivírico pseudotipificado, comprendiendo dicho método: cotransfectar una línea celular encapsulante con un gen gag/pol lentivírico psi-negativo, un vector de expresión lentivírico psi-positivo, y uno o dos vectores de expresión psi-negativos que codifican las proteínas H y F de morbillivirus truncadas, en el que las porciones citoplásmicas de dichas proteínas F y H están truncadas por la delección de restos aminoácidos de dichas porciones citoplásmicas, y en el que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos 1 resto aminoácido de carga positiva y no más de 9 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo N-terminal de la región citoplásmica de la proteína F, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir una pseudotipificación eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión, en el que la porción citoplásmica truncada de la

proteína H comprende al menos 9 y no más de 19 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo C-terminal de la porción citoplásmica de la proteína H más una metionina adicional en el N-terminal. Preferiblemente, el morbillivirus es un virus del sarampión, o la cepa Edmonston del virus del sarampión.

5 En otra realización, la invención se dirige a un método para seleccionar anticuerpos en un sistema de mamífero, que comprende:

(a) proporcionar un banco de partículas de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una pluralidad de diferentes partículas de vector lentivírico pseudotipificado según la presente invención, en el que las proteínas H truncadas de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado tienen un anticuerpo monocatenario diferente en su ectodominio, y las partículas de vector comprenden también un vector de expresión lentivírico bicistrónico, en el que dicho vector de expresión codifica el anticuerpo monocatenario de la respectiva partícula de vector lentivírico pseudotipificado y un gen indicador expresable;

(b) poner en contacto la población de células que expresan un marcador celular con el banco de la etapa (a), bajo condiciones que permiten la transducción de las células por dichas partículas de vector;

15 (c) seleccionar las células que expresan el gen indicador expresable transducido por una partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a); y

(d) determinar la información genética del anticuerpo monocatenario de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado que transduce la célula a partir de las células seleccionadas de la etapa (c).

En otra realización, la invención se dirige a un método para la detección o la selección de células que expresan un marcador celular específico, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la presente invención, en el que la proteína H truncada de dicha partícula de vector tiene un anticuerpo monocatenario o un ligando con dicho marcador celular específico en su ectodominio, y dicha partícula de vector comprende también un vector de expresión, en el que dicho vector de expresión codifica un gen indicador expresable; (b) poner en contacto la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a) con al menos una célula bajo condiciones que permiten la transducción de al menos una célula por dicha partícula de vector; y (c) detectar o seleccionar la célula o células que expresan el gen indicador expresable. Preferiblemente, la identificación se realiza en poblaciones de células vivas o en cultivos de órganos.

Por último, en otra realización, la invención se dirige a un método para identificar el antígeno de un anticuerpo o el receptor de un ligando, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la invención, en el que la proteína H truncada de dicha partícula de vector tiene un anticuerpo monocatenario o un ligando conocido en su ectodominio dirigido contra o que se une a un antígeno o a un receptor sobre una célula, y dicha partícula de vector comprende también un vector de expresión, en el que dicho vector de expresión codifica un gen indicador expresable; (b) transducir células con un banco de expresión de la célula de la etapa (a); (c) poner en contacto la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a) con las células transducidas de la etapa (b); (d) seleccionar las células que expresan el gen indicador expresable; y (e) determinar la información genética del antígeno o del receptor a partir de las células seleccionadas de la etapa (d).

Otras realizaciones de la presente invención de la presente invención se describen en las reivindicaciones y en la descripción detallada de la invención.

Definiciones

Las "partículas de vector", tal como se emplean en la presente invención, se refieren a vectores deficientes en la replicación. Así, las partículas de vector lentivírico de la presente invención son vectores lentivíricos que contienen un ARN que, tras la infección de un hospedante o una célula diana, sufre una transcripción inversa y se inserta en el genoma de dicha célula. Sin embargo, estas partículas de vector solo contienen un genoma incompleto del lentivirus del cual se derivan. En general, la molécula de ARN de la partícula de vector no comprende la información genética de los propios genes *gag*, *env* o *pol*, que es un requisito mínimo conocido para la replicación satisfactoria de un retrovirus. Como resultado, las partículas de vector son deficientes en la replicación, es decir, no son capaces de transducir un hospedante o una célula diana con la información genética requerida para su propia replicación.

Así, una partícula de vector comprende un mínimo de las proteínas Gag, Pol y Env, y una molécula de ARN (que puede ser un vector de expresión). Las proteínas Gag, Pol y Env necesarias para ensamblar la partícula de vector se derivan del retrovirus y se proporcionan *in trans* por medio de una línea celular encapsulante, por ejemplo, HEK-293T. La molécula de ARN se deriva del genoma del retrovirus, pero no comprende al menos uno de los propios genes *gag*, *env* o *pol*. Sin embargo, para producir una partícula de vector segura y eficaz, en general carece de estos tres genes, así como de cualquier otro gen no esencial. En el caso del VIH-1, estos genes innecesarios del genoma del VIH-1 que pueden delecionarse de la molécula de ARN incluyen *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*.

La molécula de ARN sigue comprendiendo todos los elementos, por ejemplo, el elemento psi y las LTR, del genoma retroviral que son necesarios para un encapsulamiento eficaz del ARN en las partículas de vector resultantes. En el caso de un vector de expresión, la molécula de ARN preferiblemente comprende otro gen (generalmente heterólogo)

que está bajo el control de un promotor adecuado, por ejemplo, el promotor de CMV, y así se expresa tras la integración del gen en el genoma del hospedante o la célula diana.

5 Por tanto, un ejemplo de una molécula de ARN que puede utilizarse para generar una partícula de vector retroviral se basa en el genoma del VIH-1 y comprende las LTR, el elemento psi y el promotor de CMV seguido del gen que se va a transducir, por ejemplo, el gen para una proteína GFP. Los genes *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* del VIH-1 se retiran, o se evita la expresión de sus productos génicos, por ejemplo, mediante una mutación o mutaciones de desplazamiento del marco. Los requisitos mínimos para un vector de lentivirus basado en VIH-1 se han descrito en Kim *et al.* (J. Virology, 72:811-816, 1998).

10 La molécula de ARN descrita anteriormente, junto con las proteínas *gag*, *pol* y *env*, proporcionadas *in trans* por la línea celular encapsulante, después se ensamblan en las partículas de vector, que serán capaces de infectar de modo eficaz a sus células diana u hospedantes, realizar la transcripción inversa de la molécula de ARN que puede comprender un gen heterólogo bajo el control del promotor de CMV, e integrar dicha información genética en el genoma de las células diana/hospedantes. Sin embargo, puesto que la información genética para las proteínas *gag*, *pol* y *env* no está presente sobre la molécula de ARN transducida, las partículas de vector serán deficientes en la replicación, es decir, la célula transducida no generará una nueva generación de dichas partículas de vector.

15 El término "pseudotipificado" y las expresiones "vector pseudotipificado" o "partícula de vector pseudotipificado", tal como se emplean en la presente invención, se refieren a una partícula de vector que porta glicoproteínas de la envuelta derivadas de otros virus que tienen envuelta. Por tanto, la gama de hospedantes de las partículas de vector de vectores lentivirales de la presente invención puede expandirse o alterarse dependiendo del tipo de receptor de la superficie celular utilizado por la glicoproteína.

20 Tal como se explica en la anterior sección, las proteínas *gag*, *pol* y *env* necesarias para ensamblar la partícula de vector son proporcionadas *in trans* por medio de una línea celular encapsulante, por ejemplo, HEK-293T. Esto generalmente se realiza mediante la transfección de la línea celular encapsulante con uno o más plásmidos que contienen los genes *gag*, *pol* y *env*. Para la generación de vectores pseudotipificados, el gen *env*, que originariamente se deriva del mismo retrovirus que los genes *gag* y *pol* y que la molécula de ARN o vector de expresión, se intercambia por la proteína o proteínas de la envuelta de un virus con envuelta diferente. Como ejemplo, se emplea la proteína F y H de MeV.

25 Así, un ejemplo de partícula de vector pseudotipificado basada en el retrovirus VIH-1 comprende (1) las proteínas Gag y Pol de VIH-1, (2) una molécula de ARN derivada del genoma del VIH-1 que puede utilizarse para generar una partícula de vector retroviral basada en el genoma del VIH-1 que carece de los genes *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, pero que aún comprende las LTR, el elemento psi y un promotor de CMV seguido del gen que se va a transducir, por ejemplo, un gen para la proteína GFP, y (3) las proteínas F y H de MeV_{Edm}, por ejemplo, en una forma truncada según se describe en la presente invención.

30 La partícula de vector pseudotipificado resultante mostrará así el tropismo de MeV_{Edm}, es decir, tendrá la capacidad para transducir de forma eficaz células que expresan las proteínas CD46 y/o SLAM sobre su superficie.

35 Las partículas de vector lentiviral "dirigidas a la entrada en la célula" o "dirigidas" son partículas de vector pseudotipificado de la presente invención en las que la proteína H es una proteína quimérica que no interacciona con CD46 o SLAM, y que también tiene un anticuerpo monocatenario, un factor del crecimiento o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio. Así, la gama de hospedantes de las partículas de vector lentiviral dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención no se expande o altera dependiendo del tropismo del virus del cual se deriva la proteína H, sino que depende de la especificidad del anticuerpo monocatenario, el factor del crecimiento o el ligando condensado con la proteína H.

40 Una partícula de vector pseudotipificado "derivada", por ejemplo, del VIH-1, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una partícula de vector en la que la información genética para el ARN y/o las proteínas Gag y Pol comprendida por la partícula de vector surge originariamente de dicho retrovirus, en el caso anterior, del VIH-1. Tal como se describió anteriormente, el genoma retroviral original puede comprender mutaciones, tales como deleciones, mutaciones de desplazamiento de marco e inserciones.

45 Las expresiones "porción citoplásmica", "cola citoplásmica" o "región citoplásmica", tal como se emplean en la presente invención, se refieren a la porción de la proteína respectiva que es adyacente al dominio transmembrana de la proteína y, si la proteína está insertada en la membrana bajo condiciones fisiológicas, se extiende hacia el citoplasma. Para la proteína F de MeV, el dominio transmembrana se identifica mediante la secuencia de aminoácidos "LICCC", para la proteína H de MeV, el dominio se identifica mediante la secuencia de aminoácidos "PYVL". La porción citoplásmica de la proteína F de MeV habitualmente consiste en los 33 aminoácidos C-terminales, y en el caso de la cepa Edmonston de MeV (MeV_{Edm}), consiste en la secuencia de aminoácidos "RGRCKKGEQVGMSPGLKP DLTGTSKSYVRSLS". La porción citoplásmica de la proteína H de MeV generalmente consiste en los 34 aminoácidos N-terminales, y en el caso de MeV_{Edm}, la proteína consiste en la secuencia de aminoácidos "MSPQRDRINAFYKDNPHPKGSRIVINREHLMIDR".

55 El término "truncado", tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una deleción de restos aminoácidos

de la proteína indicada. Los expertos en la técnica saben que una proteína es codificada por un ácido nucleico. Así, "truncado" también se refiere a los correspondientes ácidos nucleicos codificadores en una molécula de ácido nucleico que codifican una proteína "truncada" concreta. Además, debe entenderse que también se incluyen las moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína modificada o truncada específica de la presente invención, y viceversa. Por ejemplo, esto significa que si se indica una proteína concreta, por ejemplo, una proteína F truncada, tal como Fc Δ 30, también se incluye el ácido nucleico que codifica dicha proteína en la presente invención. Además, de forma similar, también se incluyen las moléculas de ácidos nucleicos que comprende esta molécula de ácido nucleico que codifica una proteína concreta de la invención, por ejemplo, vectores plasmídicos o de expresión.

En la presente invención, se mencionan las proteínas "H truncadas" o "F truncadas", que indican las proteínas de morbillivirus, preferiblemente las proteínas H y F de MeV, respectivamente, cuya porción citoplásmica ha sido truncada, es decir, se han delecionado restos aminoácidos (o ácidos nucleicos codificadores de la correspondiente molécula de ácido nucleico que codifica la proteína). Hc Δ X y Fc Δ X indican estas proteínas H y F truncadas, respectivamente, en las que X restos de la porción citoplásmica han sido delecionados.

La porción citoplásmica de la proteína F está localizada en el extremo C-terminal de la proteína. Así, cuando se determina la secuencia deseada, se empieza a contar desde el extremo C-terminal de la proteína F. Como ejemplo, si se comienza a partir de la proteína F de MeV_{Edm} que tiene la secuencia descrita anteriormente, Fc Δ 24 indica una proteína F que tiene una porción citoplásmica con la secuencia de aminoácidos "RGRCNKKGE", mientras que Fc Δ 30 indica una proteína F que tiene una porción citoplásmica con la secuencia de aminoácidos "RGR".

Por contraste, la porción citoplásmica de la proteína H está localizada en el N-terminal. Así, cuando se determina la secuencia deseada, se empieza a contar desde el segundo resto aminoácido extremo N-terminal de la proteína H (es decir, omitiendo el primer resto metionina). Como ejemplo, si se comienza a partir de la proteína H de MeV_{Edm} que tiene la secuencia descrita anteriormente, Hc Δ 18 indica una proteína H que tiene una porción citoplásmica con la secuencia de aminoácidos "MGSRIVINREHLMIDR", mientras que Hc Δ 19 indica una proteína H que tiene una porción citoplásmica con la secuencia de aminoácidos "MSRIVINREHLMIDR". Además, Hc Δ X+YZ indica una proteína H truncada, en la que X restos de la porción citoplásmica han sido delecionados tal como se describió anteriormente, y en la que se ha añadido un número de restos aminoácidos Y a la porción N-terminal del resto de la porción citoplásmica (de nuevo omitiendo el primer resto metionina). Z indica, por el código de aminoácidos de una sola letra, el resto aminoácido que se va añadir Y veces. Así, por ejemplo, si se comienza a partir de la proteína H de MeV_{Edm} que tiene la secuencia descrita anteriormente, Hc Δ 24+4A indica una proteína H que tiene una porción citoplásmica con la secuencia de aminoácidos "MAAANREHLMIDR".

De forma sorprendente, los inventores han descubierto que el dominio citoplásmico de la proteína F puede truncarse para comprender al menos 1 resto aminoácido de carga positiva, y que la porción citoplásmica de la proteína H puede truncarse para comprender al menos 9 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica C-terminal de la proteína H más una metionina adicional en el N-terminal. Sin embargo, se espera que sea factible otro truncamiento de la porción citoplásmica de la proteína H, si la proteína H se trunca para permitir una pseudotipificación eficaz y siga manteniendo la función de apoyo a la fusión.

Los expertos en la técnica son capaces de introducir mutaciones con facilidad, como, por ejemplo, adiciones y delecciones, en un ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos concretos. Estas metodologías conocidas se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989).

Empleando las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente, los expertos en la técnica pueden diseñar otras estructuras de ácidos nucleicos que tengan funciones particularmente deseadas en diversos tipos de aplicaciones. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden construir oligonucleótidos o polinucleótidos para su uso como cebadores en procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la reacción de reparación de cadena (RCR), el ensayo de acoplamiento de oligonucleótidos-PCR (PCR-OLA), y similares. También pueden construirse oligonucleótidos útiles como sondas en estudios de hibridación, tales como hibridación *in situ*. Se conocen numerosos métodos para marcar estas sondas con radioisótopos, marcadores fluorescentes, enzimas y restos de unión (por ejemplo, biotina), y así las sondas de la presente invención pueden adaptarse para su detectabilidad de una manera sencilla.

Pueden diseñarse y fabricarse oligonucleótidos para otros fines. Por ejemplo, la presente invención permite a los expertos en la técnica diseñar oligonucleótidos antisentido y oligonucleótidos formadores de tríplex para su uso en el estudio de relaciones de estructura/función. Puede ponerse en práctica una recombinación homóloga adaptando el ácido nucleico de la invención para su uso como medio de transporte dirigido.

La invención incluye, en particular, secuencias de ácidos nucleicos o sus homólogos, o fragmentos exclusivos de estas. En la presente invención, la secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína resultante se considera homóloga con una segunda molécula de ácido nucleico si la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de ácido nucleico es al menos aproximadamente 70% homóloga, preferiblemente al menos aproximadamente 80% homóloga, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, 90%, 95% o 99% homóloga con la secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico. La homología entre dos secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse con facilidad utilizando el algoritmo BLASTN conocido (Altschul, *et al.*, 1990) con los

ajustes por defecto. Como ejemplo adicional, otro ensayo conocido para determinar la homología de dos secuencias de ácidos nucleicos es comprobar si se hibridan bajo condiciones de hibridación normales, preferiblemente bajo condiciones de hibridación rigurosas.

5 La proteína codificada por el ácido nucleico de la presente invención también incluye los homólogos funcionales. Una proteína se considera un homólogo funcional de otra proteína para una función concreta si el homólogo tiene una función similar a la proteína original. El homólogo puede ser, por ejemplo, un fragmento de la proteína, o un mutante de sustitución, adición o delección de la proteína.

10 La determinación de que dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente homólogas se basa generalmente en búsquedas FAST según Perason y Lipman (1988). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una primera proteína se considera que es homóloga con la secuencia de una segunda proteína si la secuencia de aminoácidos de la primera proteína comparte al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 80% de identidad, y más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia de la segunda proteína.

15 “Psi-positivo” y “psi-negativo”, según se emplean en la presente solicitud, se refieren a una molécula de ácido nucleico en la que el elemento psi retrovítico está presente y ausente, respectivamente. El elemento psi es una señal de acción cis localizada cerca del extremo 5' del genoma retrovítico e indica una señal de encapsulamiento, que tiene importancia durante el ensamblaje de los virus y conduce a la incorporación del ARN vírico en el núcleo vírico. Así, un ARN psi-negativo no comprende el elemento psi retrovítico y, por consiguiente, no se ensamblará en una partícula de vector de la presente invención; por contraste, un ARN psi-positivo que sí comprende dicho elemento psi se ensamblará con eficacia en la partícula de vector.

20 “Titulaciones” y “eficacia de la transducción” se refieren a la capacidad de una partícula de vector para entrar en una célula e integrar la información genética, en particular información de ARN, en el genoma de la célula. Así, el término “titulación” y la expresión “eficacia de la transducción” pueden emplearse como sinónimos. La titulación/eficacia de la transducción puede determinarse, por ejemplo, mediante la incorporación de un gen que codifica un marcador detectable, por ejemplo, bajo el control de un promotor de CMV, en el vector de expresión de la partícula de vector. Tras la transducción de dicho marcador detectable por medio de la partícula de vector, las células transducidas expresarán entonces el marcador detectable. Si el marcador detectable es, por ejemplo, la proteína GFP, el número de células infectadas por un número concreto de partículas de vector puede determinarse con facilidad, por ejemplo, mediante un análisis FACS, y se corresponde directamente con la titulación o la eficacia de la transducción de las partículas de vector que se han empleado para la transducción. Por tanto, la titulación o la eficacia de la transducción de una partícula de vector concreta se refiere al número de células transducidas con relación al número de partículas de vector utilizadas.

35 La titulación o la eficacia de la transducción se emplea como un medio para caracterizar y comparar partículas de vector con respecto a su capacidad para transducir sus células diana. Así, una partícula de vector que tenga una “mayor titulación” o una “mayor eficacia de la transducción” es capaz de transducir un mayor número de células a una concentración de partículas de vector concreta, que una partícula de vector diferente que tenga la misma concentración de partículas de vector.

40 Las expresiones “marcador celular” o “marcador de la superficie celular”, tal como se emplean en la presente invención, se refieren a una molécula presente sobre la superficie de una célula. Estas moléculas pueden ser, entre otras, péptidos o proteínas que pueden comprender cadenas de azúcares o lípidos, antígenos, cúmulos de diferenciación (CD), antígenos, anticuerpos o receptores. Puesto que no todas las poblaciones de células expresan los mismos marcadores celulares, un marcador celular puede utilizarse así para identificar, seleccionar o aislar una población concreta de células que expresan un marcador celular específico. Por ejemplo, CD4 es un marcador celular expresado por células T auxiliares, células T reguladoras, y células dendríticas. Así, las células T auxiliares, las células T reguladoras y las células dendríticas pueden ser identificadas, seleccionadas o aisladas de otro modo, entre otros, mediante un clasificador de células FACS, por medio del marcador celular CD4.

50 La expresión “secuencia de marcaje”, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a una secuencia de ácido nucleico específica y conocida. Esta secuencia de marcaje puede utilizarse, entre otras cuestiones, como punto de partida para una reacción de secuenciación. Como ejemplo, los plásmidos utilizados para la generación de bancos de las partículas de vector de la presente invención, o bancos de ADNc, pueden contener esta secuencia de marcaje. Si esta secuencia de marcaje es una secuencia de marcaje universal, es decir, si está presente en cada plásmido y, así, en los vectores de expresión de ADNc resultantes y las partículas de vector de dichos bancos, entonces cualquiera de dichos plásmidos, vectores de expresión de ADNc y partículas de vector pueden secuenciarse utilizando el mismo cebador de partida que se diseña para incluir la secuencia de marcaje universal o su complemento.

55 La expresión “marcador seleccionable” o “gen de un marcador seleccionable”, tal como se emplea en la presente invención, se refiere a un gen y su correspondiente producto que permite la detección, selección y/o aislamiento de dicho producto. Si dicho marcador seleccionable es expresado por una célula, esta célula o una población de dichas células puede detectarse, seleccionarse y/o aislarse en consecuencia.

Los marcadores seleccionables pueden ser, entre otros, una molécula, preferiblemente un péptido o una proteína, detectable mediante fluorescencia, una enzima que cataliza una reacción en la que se controla el producto resultante, una molécula que confiere resistencia, entre otros, a un antibiótico u otra sustancia tóxica, o una molécula que interacciona con una sustancia no tóxica para hacer que sea tóxica. La detección, la selección y/o el aislamiento pueden realizarse, entre otros, mediante FACS, un clasificador de células FACS, el uso de microscopía de fluorescencia, o mediante el uso de antibióticos o sustancias citotóxicas, o el uso de precursores de sustancias citotóxicas.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B muestran la secuencia de ADN y de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje (wt) H_{Edm} de MeV, en las que la porción del dominio citoplásmico se muestra en negrita.

Las figuras 2A y 2B muestran la secuencia de ADN y de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje (wt) F_{Edm} de MeV, en las que la porción del dominio citoplásmico se muestra en negrita.

Las figuras 3A-3C muestran ejemplarmente la secuencia de ADN de tres de las proteínas H truncadas derivadas de ADN wt de H_{Edm}, concretamente HcΔ18, HcΔ19 y HcΔ24+4A, respectivamente. La figura 3D muestra ejemplarmente la secuencia de aminoácidos de HcΔ18. Las figuras 3E y 3F muestran ejemplarmente la secuencia de ADN y de aminoácidos de una de las proteínas F truncadas derivadas del ADN wt de F_{Edm}, concretamente FcΔ30. Las porciones citoplásmicas se muestran en negrita. La figura 3G muestra la secuencia de ADN de la proteína HcΔ24 truncada, en la que se añaden cuatro restos alanina adicionales para producir así HcΔ24+4A. De nuevo, las porciones citoplásmicas se muestran en negrita.

Las figuras 4A y 4B proporcionan una visión global de ejemplos de proteínas mutantes F y H generadas, en comparación con sus respectivas moléculas wt, indicando los restos aminoácidos delecionados (o añadidos) en la porción citoplásmica de las proteínas.

Las figuras 5A y 5B muestran las secuencias de ADN (SEQ ID NO:1) y de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de la molécula HmutscFvCD20Δ18 resultante derivada de HcΔ18. Los cuatro sitios de mutación están subrayados, los sitios de restricción Sfil y NotI, que flanquean a scFvCD20, están indicados en cursiva, y el marcador HIS está subrayado y en cursiva. La figura 5C muestra el mapa plasmídico del plásmido HmutscFvCD20Δ18.

Las figuras 6A y 6B muestran la secuencia de ADN y de aminoácidos de un ligando EGF (los sitios de restricción Sfil y NotI están indicados en cursiva), que se empleó para construir una correspondiente molécula HmuEGFΔ18 (SEQ ID NO:3 y 4).

Las figuras 7A-7D muestran ejemplos de fotografías microscópicas de células HT1080 transducidas con las partículas de vector pseudotipificado, es decir, la transducción de GFP de células HT1080 por medio de las partículas de vector lentivírico de la invención pseudotipificado con FcΔ30/HcΔ18, FcΔ30/HcΔ19, FcΔ30/HcΔ24+4A, y Fwt/Hwt, respectivamente. En todos los casos, las células HEK-293T se cotransfectaron con el plásmido encapsulante pCMVΔR8.9 y el plásmido del gen indicador GFP.

La figura 8A demuestra que las células HT1080 que expresan CD46 y SLAM son transducidas claramente y con eficacia por las partículas de vector pseudotipificado con células HT1080-CD20 (en las que las células también expresan CD20), mientras que la figura 8B muestra que esta transducción no se produce para las partículas de vector HmutscFvCD20Δ19 y FcΔ30. Las figuras 8C-F muestran los resultados para los controles positivos y negativos (figura 8C: control positivo utilizando células HT1080-CD20; figura 8D: control positivo utilizando células HT1080; figura 8E: control negativo utilizando células HT1080-CD20; figura 8F: control negativo utilizando células HT1080).

La figura 9 muestra el mapa plasmídico de pCG-HcΔ18.

La figura 10 muestra el mapa plasmídico de pCG-FcΔ30.

La figura 11 muestra el mapa plasmídico del plásmido encapsulante pCMVΔR8.9 que codifica los genes *gag* y *pol* de VIH-1.

La figura 12 muestra el mapa plasmídico del plásmido de transferencia SEW que codifica eGFP.

La figura 13 muestra la reducción en la titulación de partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con las glicoproteínas de MeV modificadas sobre células HT1080 transducidas en presencia de AZT. Las células 293T se cotransfectaron con el plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, el plásmido de transferencia que codifica GFP y los dos plásmidos que codifican los variantes de las proteínas H y F, respectivamente. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares que contienen las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HcΔ18/FcΔ30, HcΔ19/FcΔ30 o HcΔ24+4A/FcΔ30 se filtraron, se concentraron y se emplearon para la transducción de células HT1080 en presencia o ausencia de AZT 10 μM. Las titulaciones obtenidas en presencia de AZT se

normalizaron con las obtenidas en ausencia de AZT y se convirtieron en reducciones en la titulación según se lista en la tabla (a). Como ejemplo, en (b) se muestran fotografías de las células transducidas con partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HcΔ18/FcΔ30.

5 La figura 14 muestra la transducción selectiva de linfocitos que expresan CD20 de modo natural. Se emplearon partículas de vector de VIH-1 concentradas pseudotipificadas con VSV-G como control positivo (a) o con HmutscFvCD20Δ18 y FcΔ30 (b) para la transducción de la línea de células B Daudi CD20-positivas y la línea de células mieloides K-562 CD20-negativas. La fluorescencia de GFP de las células transducidas se detecta mediante FACS.

10 La figura 15 muestra el cultivo a largo plazo de células B transducidas. Células B Raji CD20-positivas fueron transducidas por partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 con el gen indicador *gfp*, y se cultivaron durante 19 días. En diferentes momentos después de la transducción se determinó el porcentaje de células GFP-positivas mediante un análisis FACS.

15 La figura 16 muestra las titulaciones relativas de partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 utilizando diferentes cantidades de los plásmidos pCG-HmutscFvCD20Δ18 y pCG-FcΔ30 para la producción de partículas de vector. La proporción de los plásmidos que codifican HmutscFvCD20Δ18 y FcΔ30, respectivamente, se tituló para la cotransfección. Las partículas de vector de VIH-1 producidas se utilizaron para la transducción de células HT1080-CD20, y las titulaciones detectadas se ajustaron con relación a la titulación de las partículas de vector con una proporción de HmutscFvCD20Δ18 a FcΔ30 de 1:1.

20 La figura 17 muestra la localización de células Raji SLAM-positivas en una población de células mixta por partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HwtΔ18/FwtΔ30. Una mezcla de células Raji SLAM-positivas y células HT1080 SLAM-negativas fue transducida por partículas de vector de VIH-1 que había sido pseudotipificado con las glicoproteínas modificadas del virus del sarampión de tipo salvaje 323. Cuarenta y ocho horas después de la transducción, las células Raji y HT1080 se separaron y se tiñeron contra CD20, que es específico para las células Raji. Después las células CD20-positivas y GFP-positivas se midieron mediante FACS.

25 La figura 18 muestra la muerte selectiva de células CD20-positivas en una población de células mixta. Las células Raji CD20-positivas y las células K-562 CD20-negativas se mezclaron en la misma proporción y después se transdujeron con partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 con el gen *gfp* encapsulado (a) o con el gen *cd34tk39* encapsulado (b). Cinco días después de la transducción, las células se tiñeron contra CD20 (a), o CD20 y CD34 (b), y se determinó el porcentaje de células doble positivas CD20/GFP y CD20/CD34, respectivamente, mediante FACS (momento del tiempo 0 h). Después, la mitad de las células transducidas se incubó en medio que contenía ganciclovir (GCV) 10 μM, y la otra mitad se dejó como control en medio sin GCV. En diferentes momentos, las células se tiñeron con los respectivos anticuerpos, y se midieron las células doble positivas mediante FACS.

35 La figura 19 muestra la transducción selectiva de células HT1080 GluR4-positivas por vectores de VIH-1 pseudotipificados con HmutscFvGluR4Δ18/FcΔ30. Las células HT1080-GluR4 y las células HT1080 de origen se transdujeron con el gen *gfp* utilizando partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvGluR4Δ18/FcΔ30. Cuarenta y ocho horas después de la transducción, las células se analizaron bajo microscopía de fluorescencia (a) o mediante FACS después de una tinción con anticuerpos contra GluR4 (b).

40 La figura 20 muestra la transducción de células B humanas primarias por partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 o VSV-G. Las células B humanas primarias se aislaron a partir de PBMC, se activaron durante 48 h con diferentes citoquinas, y después se transdujeron con partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con VSV-G (a, c) o con partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 (b). Setenta y dos horas después de la transducción, las células se tiñeron contra los marcadores de células B CD20 y CD19, y se determinó el porcentaje de células triple positivas CD20/CD19/GFP mediante FACS.

45 La figura 21 muestra la transducción dirigida de una mezcla de células B y T humanas primarias. Una mezcla de células B y T humanas primarias se activó con citoquinas y después se transdujo con partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con VSV-G como control (a) o con partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 (b). Cuarenta y ocho horas después de la transducción, las células se tiñeron contra los marcadores de células B CD20 y CD19, y se midió el porcentaje de células GFP-positivas mediante FACS.

La figura 22 muestra un mapa del plásmido encapsulante de SIVmac SIV10+.

La figura 23 muestra un mapa del plásmido de transferencia de SIVmac GAE-sffv-gfp-wpre.

55 La figura 24 muestra la transducción de células HT1080 por partículas de vector de SIVmac pseudotipificado con glicoproteínas de MeV modificadas. Las células 293T se cotransfectaron con el plásmido encapsulante de SIVmac que codifica *gag/pol*, el plásmido de transferencia que codifica GFP y los dos plásmidos que codifican los variantes de las proteínas H y F, respectivamente. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares que contienen las partículas

de vector de SIVmac pseudotipificado con HcΔ18/FcΔ30 y HcΔ19/FcΔ30, respectivamente, se filtraron, se concentraron y se utilizaron para la transducción de células HT1080.

Descripción detallada de la invención

1. Resumen: *Retroviridae* y generación de partículas de vector lentivírico

5 1. Taxonomía

Los virus de la familia taxonómica *Retroviridae* comparten, como característica principal, un genoma de ssARN de hebra positiva (ss(+)ARN). Debido a que, durante la infección, dicho ss(+)ARN no puede utilizarse directamente como molde (ARNm), la información genética de este virus primero sufre una transcripción inversa de ARN a ADN por una transcriptasa inversa proporcionada por el virus, y después se integra en el genoma del hospedante. Así, el término “retro” se refiere a la actividad de la transcriptasa inversa y a la transferencia de información genética del ARN al ADN. En la actualidad se han identificado más de 570 virus individuales de la familia.

Una subfamilia de *Retroviridae* comprende los virus *Orthoretroviridae*, que incluyen los géneros de alfa-retrovirus con la especie, por ejemplo, del virus de la leucosis aviar (ALV); los gamma-retrovirus con las especies, por ejemplo, del virus de leucemia murina (MLV), o el virus de la leucemia felina (FLV); o los delta-retrovirus con las especies, por ejemplo, del virus de la leucemia bovina (BLV), o el virus T-linfotrópico humano (HTLV).

Otro género de *Orthoretroviridae*, conocido como lentivirus, ha atraído recientemente mucho interés principalmente debido a uno de sus miembros muy conocidos, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, el género de lentivirus comprende numerosos otros virus: además de las especies VIH-1 o VIH-2, el virus de la inmunodeficiencia borina (BIV), el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) son todos sujetos frecuentes de considerables esfuerzos de investigación.

2. Características estructurales y genéticas de los genomas lentivíricos

El genoma de retrovirus competentes en la replicación conocidos comprende los cuatro dominios codificadores (*gag*, *pro*, *pol*, *env*).

El primero de los cuatro dominios codificadores (*gag*) codifica un polipéptido (Gag) cuyos productos de la ruptura son las principales proteínas estructurales del núcleo vírico y consisten en: matriz (MA), que está asociada con el interior de la envuelta del virus; cápsida (CA), una proteína estructural principal del núcleo del virión; y nucleocápsida (NC), una pequeña proteína básica que está fuertemente unida al ARN genómico vírico y forma un complejo de ribonucleoproteína dentro del núcleo.

El segundo de los cuatro dominios codificadores (*pro*) codifica parte de la poliproteína (Gag-Pro o Gag-Pro-Pol) cuyos productos de la ruptura generalmente incluyen la proteasa (PR) y a veces la dUTPasa (DU).

El tercero de los cuatro dominios codificadores (*pol*) codifica parte de la poliproteína (Gag-Pro-Pol) cuyos productos de la ruptura generalmente incluyen la transcriptasa inversa (RT) y la integrasa (IN) y, en algunos lentivirus, la dUTPasa (DU). En espumavirus, *pol* se expresa a través de un ARNm cortado como la poliproteína Pol-Pol.

Por último, *env* codifica una poliproteína (Env) cuyos productos de la ruptura SU (superficie) y TM (transmembrana) comprenden las proteínas estructurales de la envuelta vírica. Estas proteínas no son necesarias para el ensamblaje de las partículas de vector vírico con envuelta, pero sí desempeñan un papel principal en el proceso de entrada a la célula. El dominio SU se une a una molécula de receptor específico sobre la célula diana. Este acontecimiento de unión parece activar el potencial inductor de la fusión con la membrana de la proteína TM, y a través de un proceso que sigue estando en gran medida sin definir, las membranas vírica y celular se fusionan. La especificidad de la interacción de SU/receptor define la gama de hospedantes y el tropismo tisular de un retrovirus. Como consecuencia, las partículas de vector vírico que carecen de glicoproteínas de la envuelta no son infecciosas, y las células que carecen del receptor no permiten la entrada del virus. Los virus pueden unirse débilmente a células resistentes a través de interacciones relativamente no específicas, pero, en ausencia de una molécula de receptor específico, son incapaces de iniciar el proceso de infección.

Además, los retrovirus contienen dos repeticiones terminales largas (LTR), una región de varios cientos (aproximadamente 300-1800) de pares de bases compuesta por U3-R-U5 (5' a 3') que está localizada en ambos extremos del genoma no integrado e integrado (provírico).

Además, un elemento psi está presente dentro del genoma retrovírico. El elemento psi es una señal de acción en cis, localizado cerca del extremo 5' del genoma e indica una señal de encapsulamiento, que tiene importancia durante el ensamblaje del virus y conduce a la incorporación del ARN vírico al núcleo vírico.

Los retrovirus más complejos generalmente comprenden otros genes reguladores. En el caso del VIH, estos incluyen *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpu* y *vpr*.

3. Partículas de vector lentivírico y su generación

Las partículas de vector lentivírico son vectores lentivíricos deficientes en la replicación y son útiles para transducir una secuencia de ácido nucleico en un genoma diana/del hospedante. Estas partículas de vector comprenden un mínimo de las proteínas Gag, Pol y Env, y una molécula de ARN, que puede ser un vector de expresión. Esta molécula de ARN o vector de expresión habitualmente se deriva del genoma del retrovirus original, lo cual significa que comprende todos los elementos necesarios para un encapsulamiento eficaz en las partículas de vector lentivírico resultantes (entre otros, el elemento psi y LTR). Sin embargo, para que la partícula de vector lentivírico sea deficiente en la replicación, la molécula de ARN no debe comprender la información genética de los propios genes *gag*, *env* o *pol*. En lugar de esto, en el vector de expresión está presente una secuencia de ácido nucleico normalmente heteróloga que se va a integrar en el genoma diana/del hospedante. Los requisitos mínimos para un vector lentivírico basado en VIH-1 se han descrito, por ejemplo, en Kim *et al.* (J. Virology, 72:811-816, 1998).

Así, para generar vectores lentivíricos, son necesarios tres componentes básicos, que habitualmente se proporcionan en plásmidos separados: un gen *gag/pol* psi-negativo, un gen *env* psi-negativo, y un vector de expresión psi-positivo. La cotransfección de estos componentes en una línea celular encapsulante, es decir, una línea celular eucariota adecuada, conduce a la expresión de las proteínas Gag, Pol y Env, así como a la generación de ARN psi-positivo (sin embargo, el uso de líneas celulares que están transfectadas de modo estable con uno o más componentes básicos es ciertamente posible). Puesto que los genes *gag/pol* y *env* son psi-negativos, el ARNm generado antes de la expresión de las correspondientes proteínas no se ensamblará en las partículas de vector lentivírico. En contraste con esto, el ARN psi-positivo transcrito a partir del vector de expresión será incluido en la partícula de vector lentivírico resultante.

Por consiguiente, se generarán partículas de vector lentivírico deficientes en la replicación que comprenden las proteínas Gag, Pol y Env proporcionadas *in trans* por la línea celular encapsulante, así como la transcripción de ARN psi-positivo del plásmido de expresión que carece de la información genética para una replicación autónoma. Sin embargo, puesto que las partículas de vector lentivírico comprenden las proteínas Gag, Pol y Env, serán capaces de infectar con eficacia a sus células diana/hospedantes, realizar la transcripción inversa de su ARN, e integrar dicha información genética en el genoma de la diana/hospedante.

4. Partículas de vector lentivírico heterólogo pseudotipificado

La gama de hospedantes de los vectores lentivíricos puede expandirse o alterarse mediante un proceso denominado pseudotipificación. Se entiende que, en general, el proceso de pseudotipificar un lentivirus o una partícula de vector lentivírico produce una partícula de vector lentivírico que consiste en una partícula de vector lentivírico que porta glicoproteínas derivadas de otros virus con envuelta. Estas partículas de vector poseen el tropismo del virus del cual se deriva la glicoproteína o glicoproteínas.

Tal como se describió anteriormente, para generar partículas de vector lentivírico son necesarios tres componentes básicos, habitualmente proporcionados en plásmidos separados. Dentro de una línea celular encapsulante, son necesarios un gen *gag/pol* psi-negativo del lentivirus original, un gen *env* psi-negativo del lentivirus original, y un vector de expresión psi-positivo. Para las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, el gen *env* del retrovirus original es reemplazado por uno o más genes de la envuelta de otro virus con envuelta, por ejemplo, los genes que codifican las proteínas F y H de MeV. Además, el ARN transcrito desde el vector de expresión psi-positivo se ensamblará en la partícula de vector lentivírico resultante. Este vector de expresión psi-positivo habitualmente se deriva del genoma del retrovirus original, lo cual significa que comprende todos los elementos necesarios para un encapsulamiento eficaz en las partículas de vector lentivírico pseudotipificado resultantes. Además, este vector de expresión puede portar al menos un gen que se va a transducir, es decir, que va a integrarse en el genoma de la célula diana y, en último término, será expresado por dicha célula.

Varias de las proteínas necesarias para ensamblar las partículas de vector lentivírico pseudotipificado son perjudiciales para las células de mamífero cuando son sobreexpresadas. Así, para la producción estable de partículas de vector lentivírico pseudotipificado, se generaron líneas celulares basadas en 293 que permiten la producción condicional de proteínas codificadas por el virus empleando promotores regulados por tetraciclina (por ejemplo, véase Xu *et al.*, 2001). En una realización, la célula encapsulante utilizada para producir las partículas de vector lentivírico pseudotipificado de la presente invención es HEK-293T.

El elemento "psi" indicado anteriormente se refiere a una señal de encapsulación, que conduce a la incorporación (el "encapsulamiento") del ARN transcrito desde el vector de expresión en las partículas de vector durante el ensamblaje de las partículas de vector. Así, "psi" indica la señal de encapsulamiento retroviral que controla con eficacia el encapsulamiento del ARN mensajero del vector de expresión. Para que se produzca el encapsulamiento, el vector de expresión también debe estar flanqueado por secuencias de repetición terminal largas (LTR) específicas, de modo que la transcripción del ARN del vector de expresión en ADN y la posterior integración en el genoma de la célula diana pueda realizarse con éxito.

Por consiguiente, durante el ensamblaje de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, ni el ARN del gen *gag/pol* ni el del gen de la envuelta que codifica, por ejemplo, las proteínas F y H de MeV se incorpora en las partículas de vector lentivírico. Estos genes solo son transcritos en ARN por la maquinaria de transcripción de la célula de encapsulación y después se traducen en proteínas funcionales. Por contraste con esto, el vector de

expresión psi-positivo se traduce en el correspondiente ARN y, debido a la presencia del elemento psi y las LTR, se incorporará en las partículas de vector lentivírico resultantes y, en último término, se transducirá en el genoma de la célula hospedante.

II. Las partículas de vector lentivírico de la presente invención

5 1. Partículas de vector lentivírico

Las partículas de vector lentivírico de la presente invención en general son producidas basándose en vectores de expresión lentivíricos psi-negativos. De forma inesperada, se ha descubierto que dichas partículas de vector lentivírico pseudotipificado con las proteínas F/H de MeV producen una titulación que es aproximadamente 100 veces mayor que la titulación de partículas de vector basadas en vectores de expresión de MLV pseudotipificados con las F/H de MeV.

Aunque cualquier vector de expresión lentivírico puede utilizarse de modo adecuado según la presente invención, el vector de expresión lentivírico utilizado para la producción de las partículas de vector lentivírico se basa preferiblemente en un vector seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV (virus de la anemia infecciosa equina). Para los expertos en la técnica será obvio que no es necesario que estos vectores de expresión lentivíricos comprendan la información genómica completa del respectivo lentivirus; por el contrario, estos vectores lentivíricos solo necesitan comprender los elementos necesarios para el encapsulamiento eficaz en las partículas de vector lentivírico resultantes (véase anteriormente).

En otra realización, la partícula de vector lentivírico pseudotipificada de la invención se deriva de un lentivirus, preferiblemente se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV, y aún más preferiblemente se deriva del VIH-1

2. Partículas de vector lentivírico heterólogo pseudotipificado

Para generar las partículas de vector lentivírico de la presente invención, el gen *env* del lentivirus original se intercambia por las proteínas H y F truncadas de un morbillivirus, o MeV, que son coexpresadas en la célula encapsulante. Las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, por ejemplo, con las proteínas F y H de MeV, de forma inesperada muestran mayores titulaciones y eficacias de transducción superiores a los vectores conocidos, que generalmente portan la proteína G de VSV o proteínas de la envuelta derivadas de MLV o GaLV (virus de la leucemia del gibón).

A continuación se describen las propiedades de *Morbilliviridae* y se ejemplifican utilizando el virus del sarampión (MeV). Sin embargo, a los expertos en la técnica les resultará evidente que las propiedades, ejemplificadas por MeV, también se aplican en general para *Morbilliviridae*.

Tal como se describió anteriormente, la envuelta de MeV comprende las glicoproteínas de hemaglutinina (H) y de fusión (F). Mientras que la proteína H se une a los receptores de MeV CD46 y SLAM, la proteína F porta un péptido de fusión hidrófobo que media en la fusión de membrana tras la unión al receptor de H. Se cree que H de MeV existe sobre la superficie vírica como un tetrámero que consiste en un dímero de dos dímeros unidos covalentemente, mientras que se considera que F trimeriza. Tras la síntesis como un precursor inactivo F0, la proteína F es activada proteolíticamente en la red de trans-Golgi por furina para producir así un fragmento transmembrana F1 grande y un fragmento F2 pequeño. El mecanismo de la fusión a la membrana inducido por MeV puede implicar cambios conformacionales inducidos por el receptor en las proteínas H y F, lo cual sugiere una interacción dinámica entre estas dos proteínas durante el proceso de transfección.

Por contraste con muchos otros virus con envuelta, MeV fusiona su membrana de la envuelta directamente con la membrana de la superficie celular sin que sea necesaria una endocitosis de la partícula ni la reducción del pH. Esta es una propiedad concreta del virus del sarampión y los morbillivirus, que así se distinguen de muchos otros virus con envuelta que son endocitados y solo se fusionan tras la disminución en el pH tras la endocitosis. Otro aspecto importante se refiere al hecho de que la fusión de las membranas requiere a ambas proteínas, F y H. Cuando se expresa en ausencia de la proteína H, la F de MeV no induce la fusión de célula-célula. De manera interesante, la función de la proteína H en la fusión de las membranas no se limita a la unión al receptor, sino que H también está implicada específicamente en apoyar a la proteína F en su función de fusión de las membranas. Se ha demostrado que solo las parejas homólogas de proteínas F y H de MeV son capaces de activar la fusión de las membranas (Cattaneo y Rose, 1993; J. Virol., 67, 1493-1502). Las proteínas H que actúan perfectamente en el reconocimiento del receptor no son suficientes para la fusión de las membranas, y deben interaccionar de modo adecuado con la proteína F. Incluso una identidad de aminoácidos del 97-99% en proteínas F y H de diferentes cepas de MeV puede no ser suficiente para la fusión de las membranas en ciertas parejas de F/H. Así, es evidente que existen interacciones cooperativas muy específicas entre F y H para permitir que se produzca la fusión de las membranas. Es muy probable que lo que sucede a nivel molecular sea que la proteína H, cuando se pone en contacto con el receptor, sufre un cambio conformacional que, en sí mismo, induce un cambio conformacional en la proteína F, que entonces expone el péptido de fusión e induce la fusión de las membranas.

De manera interesante, existen algunas pruebas experimentales que indican que la formación de un complejo de las

proteínas F y H de MeV se diferencia de la de otros paramixovirus. Mientras que las proteínas H(N) y F de otros paramixovirus parecen interactuar funcionalmente solo en la superficie celular (para así evitar la fusión en los compartimentos celulares inapropiados después de la ruptura de furina), se ha demostrado que las proteínas H y F de MeV interactúan en el RE (Plemper *et al.*, 2001). Así, MeV debe adoptar un mecanismo diferente para evitar la fusión prematura, o no necesita en absoluto esta estrategia. El receptor para todos los *Paramyxoviridae* que tienen actividad neuraminidasa es el abundante receptor de ácido siálico gangliósido. Por contraste, los receptores de MeV CD46 o SLAM pueden estar menos disponibles que el ácido siálico para una fusión temprana, y así esto se traduce en que el problema de una fusión intracelular inapropiada sea menos pronunciado para MeV.

Se describe una partícula de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una proteína de fusión (F) y una proteína de hemaglutinina (H) de un morbillivirus, en la que las porciones citoplásmicas de dichas proteínas F y H están truncadas, y en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos 1 resto aminoácido de carga positiva, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir una pseudotipificación eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión. En una realización, la invención se dirige a una partícula de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una proteína de fusión (F) y una proteína de hemaglutinina (H) de un morbillivirus, en la que las porciones citoplásmicas de dichas proteínas F y H están truncadas por la delección de restos aminoácidos de dichas porciones citoplásmicas, y en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos 1 resto aminoácido de carga positiva y no más de 9 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo N-terminal de la porción citoplásmica de la proteína F, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir una pseudotipificación eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión, en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína H comprende al menos 9 y no más de 19 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo C-terminal de la porción citoplásmica de la proteína H, más una metionina adicional en el N-terminal. Preferiblemente, el morbillivirus es un virus del sarampión, o la cepa Edmonston del virus del sarampión. Se describe que la porción citoplásmica truncada de la proteína H puede comprender al menos 9 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica C-terminal de la proteína H, más una metionina adicional en el N-terminal. Se describe que la porción citoplásmica truncada de la proteína F puede comprender al menos 3 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica N-terminal de la proteína F, y que la porción citoplásmica truncada de la proteína H puede comprender al menos 13 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica C-terminal de la proteína H, más una metionina adicional en el N-terminal, pudiendo estar de uno a cuatro de los restos aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica C-terminal de la proteína H reemplazados por restos alanina. En otra realización aún más preferida, la proteína F truncada es Fc Δ 24 o Fc Δ 30 y/o la proteína H truncada se selecciona del grupo que consiste en Hc Δ 14, Hc Δ 15, Hc Δ 16, Hc Δ 17, Hc Δ 18, Hc Δ 19, Hc Δ 120, Hc Δ 21+A y Hc Δ 24+4A.

Las partículas de vector lentivírico de la presente invención, pseudotipificado con las proteínas F y H de morbillivirus, pueden utilizarse así para transducir células (o líneas celulares) con eficacia que portan al menos uno de los dos receptores de MeV CD45 y SLAM.

En otra realización, las partículas de vector lentivírico de la presente invención son capaces de transducir células que expresan al menos uno de CD46 y SLAM. En una realización preferida, las partículas de vector lentivírico de la presente invención son capaces de transducir células seleccionadas del grupo que consiste en HT1080, HEK-293T, U-87MG, A301 y A-431.

En otra realización, las partículas de vector lentivírico de la presente invención son capaces de transducir selectivamente células que expresan SLAM. Por tanto, estas partículas no son capaces de transducir células que no están expresando SLAM. De modo específico, este efecto se logra con partículas que interactúan específicamente con SLAM, pero no con CD46. En particular, la proteína H del virus del sarampión de la cepa Edmonston del virus del sarampión contenida en dichas partículas interactúa específicamente con SLAM, pero no con CD46. Esto puede lograrse introduciendo mutaciones puntuales en la proteína H. Una de estas mutaciones puntuales puede ser Y481A. Otras realizaciones se refieren a proteínas H en las que Y481 ha sido reemplazado por cualquier otro aminoácido, en particular, con metionina o glutamina, o que presentan mutaciones en una posición seleccionada de F431, V451, Y452, A527, P486, I487, A428, L464, G546, S548, F549, en las que estos aminoácidos están reemplazados por otros aminoácidos y esta mutación evita o ayuda a evitar la interacción de la proteína H con CD46. Además de las anteriores mutaciones de sustitución, puede introducirse S548L y F549S para reducir aún más la interacción de la proteína H con CD46. Como alternativa, el reemplazamiento de los cinco restos consecutivos 473 a 477 en la proteína H por alanina puede evitar la interacción de la proteína H con CD46. Cualquiera de las mutaciones indicadas anteriormente puede combinarse con las otras (véase, Nakamura *et al.* (2004), Nat. Biotech., 22 (3), p. 331-336; Nakamura *et al.* (2005), Nat. Biotech., 23 (2), p. 209-214; Vongpunsawad *et al.* (2004), J. Virol., 78 (1), p. 302-313; Masse *et al.* (2002), J. Virol., 76 (24), p. 13034-13038; Masse *et al.* (2004), J. Virol., 78 (17), p. 9051-9063; Patterson *et al.* (1999), Virology, 256, p. 142-151). Como alternativa, puede utilizarse la proteína H del virus del sarampión de tipo salvaje, como por ejemplo la cepa IC-B, para pseudotipificar las partículas de vector lentivírico (véase el ejemplo 5.3). Estas proteínas H, en la naturaleza, solo reconocen a SLAM, pero no a CD46, como receptor (Yanagi *et al.* (2006), Jpn. J. Infect. Dis., 59 (1) p. 1-5).

De modo sorprendente, se ha descubierto que la proporción entre la cantidad de plásmido que codifica la proteína F y H truncada, respectivamente, utilizada para la producción de las partículas de vector, tiene un efecto significativo

sobre las titulaciones de las partículas de vector resultantes. Esto significa que la proporción de las proteínas F y H truncadas que se incorporan en las partículas de vector lentivírico descritas en la presente tiene un efecto real sobre la titulación resultante y, así, sobre la eficacia de la transducción de dichas partículas de vector.

5 En general, una mayor cantidad de plásmido que codifica la proteína F truncada, comparado con la cantidad de plásmido que codifica la proteína H truncada, conduce a una mayor titulación y una mayor eficacia de la transducción de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado resultante.

10 Así, en otra realización de la invención, la cantidad de plásmido que codifica la proteína F truncada utilizada durante la producción de la partícula de vector lentivírico es mayor que la del plásmido que codifica la proteína H truncada. Preferiblemente, la cantidad de plásmido que codifica la proteína F truncada durante la producción es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500% mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, o es más del 1000% mayor que la cantidad del plásmido para la proteína H truncada utilizado para la producción de la partícula de vector lentivírico¹. En una realización aún más preferida, la cantidad del plásmido que codifica la proteína F truncada es 700% mayor que la cantidad del plásmido que codifica la proteína H truncada.

15 Puede suponerse que la cantidad del plásmido que codifica las proteínas F y H, que se emplean para producir la partícula de vector lentivírico, se corresponde con la cantidad de la respectiva proteína codificada incorporada en la partícula de vector lentivírico resultante de un modo lineal.

20 Por consiguiente, en otra realización de la invención, la cantidad de la proteína F truncada en la partícula de vector lentivírico es mayor que la cantidad de la proteína H truncada en la partícula de vector lentivírico. Preferiblemente, la cantidad de la proteína F truncada en la partícula de vector lentivírico es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500% mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, o es más del 1000% mayor que la cantidad de la proteína H truncada en la partícula de vector lentivírico de la presente invención. En una realización aún más preferida, la cantidad de la proteína F truncada en la partícula de vector lentivírico es 700% mayor que la cantidad de la proteína H truncada.

3. Partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula

25 Los descubrimientos de la presente invención también son importantes para generar las partículas de vector lentivírico de transporte dirigido que presentan una mayor selectividad de entrada a la célula frente a otras partículas de vector conocidas, en las que la proteína H truncada derivada es una proteína mutada (Hmut) y quimérica, y que también presentan un anticuerpo monocatenario, un factor del crecimiento, o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio. Así, el C-terminal de la proteína H truncada se fusiona con un anticuerpo monocatenario, un factor del crecimiento, o un ligando con un marcador de la superficie celular.

30 La mutación de la proteína H de MeV en general impide las interacciones productivas con CD46 y SLAM, respectivamente. En una realización, esta mutación es introducida por las mutaciones puntuales Y481A y R533A de la proteína H de MeV. En otra realización, la proteína Hmut también incluye las mutaciones S548L y F549S, que conducen a una ablación más completa de la infectividad residual a través de CD46. Además, la mutación de los restos V451 y Y529 impide la interacción productiva con CD46 y SLAM. Otras mutaciones para impedir/evitar la interacción de la proteína H con CD46 se han descrito anteriormente. Todas estas mutaciones, que son introducidas en las proteínas H truncadas (Hmut Δ X) para impedir la utilización natural del receptor, están localizadas en el ectodominio de la proteína H de MeV. Para evitar la interacción de la proteína H con SLAM, uno de los siguientes restos puede reemplazarse por cualquier otro aminoácido, en particular, alanina: I194, D530, Y553, T531, P554, F552, D505, D507 (véase, Vongpunsawad *et al.* (2004), *J. Virol.*, 78 (1) p. 302-313); Mase *et al.* (2004), *J. Virol.*, 78 (17), p. 9051-9063). Las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, por ejemplo, con Fc Δ 30, y las proteínas H mutadas que también incluyen un anticuerpo monocatenario, un factor del crecimiento, o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio, ya no pueden entrar a las células a través de CD46 y SLAM, sino que son dirigidas y entran solo en las células que muestran los respectivos marcadores correspondientes en su superficie.

45 En una serie de experimentos de transporte dirigido, se descubrió que las partículas de vector lentivírico descritas en la presente pseudotipificado con una proteína F truncada y una construcción de fusión de una proteína H truncada que incluye un anticuerpo monocatenario, o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio, solo transducen células que expresan el respectivo marcador de la superficie celular para el anticuerpo monocatenario o el ligando. Por tanto, las partículas de vector entran en las células que expresan la correspondiente proteína de marcador; sin embargo, las titulaciones son significativamente menores en células que no expresan estos marcadores. Por tanto, se demostró que la transducción y la entrada en la célula empleando las partículas de vector lentivírico de la presente invención es un medio eficaz para la transferencia de genes muy selectiva a células específicas. Así, en otra realización, las partículas de vector lentivírico de la presente invención pueden utilizarse para transducir células de modo eficaz. En una realización preferida, estas células se seleccionan del grupo que consiste en células pluripotenciales, células cancerosas, células neurales, EPC, y células CD34+.

55 En otra realización, la invención se dirige a una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la invención, en la que el anticuerpo monocatenario o el ligando se dirige o se une a un marcador de cúmulo de diferenciación (CD),

un antígeno tumoral expuesto sobre la superficie celular, un receptor de tirosina quinasa, un receptor de quimioquina, un receptor acoplado a proteína G, un receptor olfativo, una proteína vírica expuesta sobre la superficie de células crónicamente infectadas, un receptor de neurotransmisor, un receptor del factor de células pluripotenciales, un receptor del factor del crecimiento, un receptor del factor del crecimiento nervioso, un receptor del factor del crecimiento epidérmico, un receptor del factor del crecimiento endotelial vascular, un receptor del factor del crecimiento de hepatocitos, un receptor de interleuquina y/o un receptor de citoquina.

En una realización preferida, los marcadores celulares de interés incluyen, sin limitarse a todos los marcadores de cúmulos de diferenciación (CD) conocidos, tales como, por ejemplo, CD4, CD8, CD19, CD20, CD33, CD34, CD133, antígenos tumorales expuestos sobre la superficie celular, tales como, por ejemplo, mucina-1, moléculas de la superficie de células del sistema nervioso, tales como, por ejemplo, receptores de neurotransmisores, tales como los receptores de dopamina, acetilcolina o GABA, receptores de tirosina quinasa, tales como, por ejemplo, EGF-R y VEGFR-2, receptores olfativos, y receptores acoplados a proteína G, y entre estos, también los receptores de quimioquinas, así como proteínas víricas expuestas sobre la superficie de células crónicamente infectadas, tal como, por ejemplo, la proteína gp120 del VIH.

CD4 es una glicoproteína expresada sobre la superficie de células T auxiliares, células T reguladoras y células dendríticas. Sobre la superficie de las células T, CD4 actúa como correceptor para el receptor de células T (TCR). De modo específico, CD4 amplifica la señal generada por TCR, reclutando la tirosina quinasa lck que es fundamental para activar numerosas moléculas implicadas en la cascada de señalización de una célula T activada. CD4 es una glicoproteína de membrana integral que se conoce como el receptor del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) para la infección de células humanas. CD4 también es un receptor importante utilizado por el VIH-1 para conseguir entrar en las células T hospedantes. El virus VIH-1 se une a CD4 a través de una proteína concreta en su envuelta vírica conocida como gp120. La unión a CD4 crea un desplazamiento en la conformación de la proteína gp120 vírica que permite al VIH-1 unirse a otros dos receptores de la superficie celular sobre la célula hospedante (concretamente, los receptores de quimioquinas CCR5 y CXCR4). Tras otro cambio en la forma de una proteína vírica diferente (gp41), el virus VIH inserta un péptido de fusión en la célula T hospedante que permite que la membrana externa del virus se fusione con la membrana de la célula T. La infección por VIH conduce a una reducción progresiva en el número de células T que poseen el receptor CD4 y, por tanto, se emplea el recuento de CD4 como indicador fisiológico para ayudar a los médicos a decidir cuándo iniciar el tratamiento médico de pacientes infectados por VIH. Así, los fármacos dirigidos a CD4, tales como, entre otros, las partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención, son útiles en la terapia del VIH. En otra realización, las partículas de vector lentivírico dirigidas a CD4 de la invención pueden utilizarse para detectar, seleccionar y/o aislar células o poblaciones de células CD4+.

CD8 se expresa sobre la superficie celular del subconjunto de linfocitos T, y tiene dos funciones definidas en términos generales como: (1) citotoxicidad restringida al complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I contra dianas infectadas por virus, alogeneicas y otras dianas celulares; y (2) inmunorregulación de otros linfocitos. CD8 es una glicoproteína que actúa como correceptor que se expresa sobre la superficie de células T citotóxicas. CD8 consiste en una cadena α y una cadena β , y ambas se asemejan a un dominio de tipo inmunoglobulina que está conectado a la membrana por un tallo delgado. CD8 muestra afinidad por la porción $\alpha 3$ de la molécula de MCH de clase I, que mantiene juntas a la célula T citotóxica y la célula diana durante la activación específica de antígeno. Las células T citotóxicas que presentan la proteína de la superficie CD8 se denominan "células T CD8+". En otra realización, las partículas de vector lentivírico dirigidas a CD8 de la invención pueden utilizarse para detectar, seleccionar y/o aislar células o poblaciones de células CD8+.

La proteína CD19 se expresa sobre la superficie de todas las células B linfoides, con la excepción de las células plasmáticas terminalmente diferenciadas, y se ha implicado como receptor transductor de señales en el control de la proliferación y diferenciación celular. CD19 está asociada físicamente con la proteína tirosina quinasa Lyn de la familia de protooncogenes src; el complejo de enzima-receptor de Lyn-CD19 asociado a la membrana desempeña un papel fundamental en la supervivencia y la clonogenicidad de precursores de células B derivados de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Así, los fármacos dirigidos a CD19, que incluyen las partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención, son útiles en aplicaciones de terapia de la leucemia linfoblástica aguda. En otra realización, las partículas de vector lentivírico dirigidas a CD19 de la invención pueden utilizarse para detectar, transducir, seleccionar y/o aislar células o poblaciones de células CD19+.

CD20 es el primer antígeno de diferenciación humano y inicialmente se detectó sobre la superficie de células humanas utilizando anticuerpo monoclonales. CD20 es una fosfoproteína no glicosilada unida a la membrana expresada sobre la superficie de células B maduras y también en precursores de células B, pero está ausente en células pluripotenciales y células B pre-pre. Tras la diferenciación de una célula B en una célula plasmática productora de anticuerpos, se pierde la expresión de CD20. Se cree que CD20 desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento, la diferenciación y la proliferación de linfocitos B activados. Así, los fármacos dirigidos a CD20, que incluyen las partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención, son útiles en estrategias terapéuticas para el cáncer. En otra realización, las partículas de vector lentivírico dirigidas a CD20 de la invención pueden utilizarse para detectar, transducir, seleccionar y/o aislar células o poblaciones de células CD20+.

CD33 es un antígeno de la superficie de células mieloides que se expresa sobre blastos en la leucemia mieloide aguda en la mayoría de los pacientes, independientemente de la edad o el subtipo de la enfermedad. Este antígeno en muchos casos también se expresa sobre células pluripotenciales leucémicas; sin embargo, CD33 no se expresa en células pluripotenciales hematopoyéticas. Así, los fármacos dirigidos a CD33, que incluyen las partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención, son útiles para su uso en terapias de la leucemia mieloide aguda. En otra realización, las partículas de vector lentivírico dirigidas a CD33 de la invención

La médula ósea y la sangre periférica de adultos generalmente comprenden un subtipo de células progenitoras que son capaces de diferenciarse en células endoteliales maduras, y así contribuyen a los procesos de reendotelialización y neovascularización. Puesto que estas células angiogénicas tienen las propiedades de los angioblastos embrionarios, se denominan células progenitoras endoteliales (EPC). En general, tres marcadores de la superficie (CD34, CD133 y el receptor del factor del crecimiento endotelial vascular-2 (VEGFR-2)) caracterizan a los angioblastos funcionales tempranos, localizados predominantemente en la médula ósea. Tras la migración hacia la circulación sistémica, las EPC gradualmente pierden sus propiedades progenitoras y comienzan a expresar marcadores endoteliales, tales como VE-cadherina, óxido nítrico sintasa endotelial y factor de von Willebrand. Así, los fármacos dirigidos a CD33, CD133 y/o VEGFR-2 que incluyen las partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención, son útiles para transducir EPC. En otra realización, las partículas de vector lentivírico dirigidas a CD33, CD133 y/o VEGFR-2 de la invención pueden utilizarse para detectar, transducir, seleccionar y/o aislar células o poblaciones de células CD33, CD133 y/o VEGFR-2, respectivamente.

El antígeno CD133 es una glicoproteína del dominio 5-transmembrana (5-TM) que se demostró inicialmente que se expresaba sobre poblaciones de células primitivas, que incluyen células progenitoras y pluripotenciales hematopoyéticas CD34, y otras células primitivas, tales como la retina y el retinoblastoma y el epitelio en desarrollo. El antígeno CD133 pertenece a una familia recién caracterizada de proteínas 5-TM. No se ha descubierto aún ningún ligando natural para la molécula de CD133, y su función precisa en el tejido hematopoyético sigue siendo desconocida. El CD133 puede proporcionar una alternativa al CD34 para la selección y expansión *in vivo* de células pluripotenciales hematopoyéticas. Se ha descubierto CD34 en una pequeña fracción de células de la médula ósea humanas. Parece que la población de células enriquecida en CD34+ procedente de la médula ósea o de sangre periférica movilizada es responsable de la mayoría de la actividad hematopoyética. Por tanto, CD34 se ha considerado el marcador más crítico para las células pluripotenciales hematopoyéticas ("hematopoietic stem cells", HSC). Un subconjunto enriquecido en CD133+ puede expandirse de una manera similar al subconjunto enriquecido en CD34+, manteniendo su capacidad multilineaje. Así, los fármacos dirigidos a CD34 y CD133, que incluyen las partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención, son adecuados para su uso en la transducción de estos diversos tipos de células pluripotenciales hematopoyéticas y otros tipos de células progenitoras relacionadas.

CD34 y el receptor de células pluripotenciales (SCF) (c-Kit) son expresados selectivamente sobre la superficie celular de células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC). Las HSC son células multipotentes que generan más HSC y todos los elementos formados en la sangre. En una primera etapa de diferenciación se forman células progenitoras. Estas son células que pueden ser multipotentes, oligopotentes o unipotentes, y carecen de una capacidad de autorrenovación significativa. Las HSC son totalmente responsables del desarrollo, mantenimiento y regeneración de los tejidos formadores de sangre para la vida. Además, las HSC son las células más importantes, sino las únicas, necesarias para el injerto en los trasplantes de tejido hematopoyético. Se mantiene que el sistema hematopoyético el tejido mejor caracterizado de todos los tejidos del cuerpo humano debido a sus propiedades biológicas exclusivas, que han permitido la manipulación experimental en estudios preclínicos y su trasplante a paciente que han sufrido una extirpación intencionada de su órgano hematopoyético. Para el aislamiento se han descrito una serie de diferentes marcadores de la superficie celular para HSC murinas y humanas. Para aplicaciones clínicas, CD34 se emplea de modo más habitual como marcador para la purificación de HSC. En otra realización, las partículas de vector lentivírico dirigidas a CD34 pueden utilizarse para la purificación de HSC.

La médula ósea y la sangre periférica de adultos generalmente comprenden un subtipo de células progenitoras que son capaces de diferenciarse en células endoteliales maduras, y así contribuyen a los procesos de reendotelialización y neovascularización. Puesto que estas células angiogénicas tienen las propiedades de los angioblastos embrionarios, se denominan así células progenitoras endoteliales (EPC). En general, tres marcadores de la superficie (CD34, CD133 y el receptor del factor del crecimiento endotelial vascular-2 (VEGFR-2)) caracterizan a los angioblastos funcionales tempranos, localizados predominantemente en la médula ósea. Tras la migración hacia la circulación sistémica, las EPC gradualmente pierden sus propiedades progenitoras y comienzan a expresar marcadores endoteliales, tales como VE-cadherina, óxido nítrico sintasa endotelial y factor de von Willebrand. Así, los fármacos dirigidos a CD33, CD133 y/o VEGFR-2 tales como, entre otros, las partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula de la presente invención, son útiles para transducir EPC.

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son la mayor familia de receptores de la membrana plasmática. Tras unirse a su agonista, un GPCR activa una proteína reguladora del nucleótido de guanina heterotrimérico intracelular (proteína G). La proteína G activada modula la actividad de una o más enzimas o canales iónicos. Los GPCR tienen en común una topología siete transmembrana y las interacciones funcionales con la proteína G. Más de 200 GPCR, que responden a una gran variedad de estímulos desde fotones, iones, aminoácidos y moléculas orgánicas pequeñas, a hormonas peptídicas y proteicas, se han identificado en el genoma humano. Se han identificado varios

- cientos más de GPCR (denominados GPCR huérfanos) para ligandos aún desconocidos, basándose en la homología con GPCR conocidos. Los GPCR, como grupo, constituyen la mayor familia de dianas para la intervención farmacológica. Están críticamente implicados en casi cualquier sistema fisiológico. Una lista parcial de ligandos de GPCR naturales incluyen glutamato, calcio, GABA, acetilcolina, histamina, GTP/ATP, adenosina, cAMP, melatonina, epinefrina, serotonina y dopamina. Los activadores de GPCR de hormonas peptídicas incluyen angiotensina, vasopresina, bradiquinina, calcitonina, FSH, glucagón, somatostatina y un gran número de quimioquinas, feromonas, opioides y cannabinoides. La transducción sensorial olfativa y gustativa implica la respuesta de GPCR a un gran conjunto de odorantes, y la visión depende del ligando retiniano activado por luz unido covalentemente a su propio GPCR de rodopsina. El transporte dirigido para la transferencia de genes selectiva a través de muchos de estos receptores que muestran un patrón de expresión muy restringido, tales como, por ejemplo, el receptor GABA α 6 en las células de gránulos cerebelares o los receptores de dopamina en la sustancia negra, tiene mucha importancia para la intervención farmacológica y para la investigación básica. En otra realización, las partículas de vector lentivírico de la invención dirigidas a receptores acoplados a proteína G pueden utilizarse para detectar, transducir, seleccionar y/o aislar poblaciones de células o células que portan GPCR.
- Los receptores de quimioquinas son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). En el último recuento se han identificado más de 600 miembros de esta superfamilia de GPCR y se han clasificado en familias. Hasta la fecha se han clonado seis CXC, diez CC y un CX3C y XC receptores de quimioquinas. La unión al receptor inicia una cascada de acontecimientos intracelulares mediados por las proteínas G heterotriméricas asociadas al receptor. Estas subunidades de la proteína G activan diversas enzimas efectoras que conducen a la activación no solo de la quimiotaxis, sino también de una amplia variedad de funciones en diferentes leucocitos, tales como un aumento en el estallido respiratorio, desgranulación, fagocitosis y síntesis de mediadores de lípidos. En otra realización, las partículas de vector lentivírico de la invención dirigidas a receptores de quimioquinas pueden utilizarse para detectar, transducir, seleccionar y/o aislar poblaciones de células o células que portan receptores de quimioquinas.
- Los receptores de tirosina quinasas (RTK) son una familia de proteínas de membrana que se unen a ligandos extracelulares, tales como insulina y factores del crecimiento (por ejemplo, receptor del factor del crecimiento derivado de plaquetas, receptor del factor del crecimiento epidérmico). Después de la unión del ligando, el dominio intracelular del receptor cataliza la autofosforilación y la fosforilación de sustratos específicos sobre restos tirosina. Las siguientes subfamilias de RTK son importantes: la familia de receptores del factor del crecimiento epidérmico (EGF), la familia de receptores del factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), la familia del receptor del factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), la familia de receptores del factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la familia de receptores del factor del crecimiento nervioso (NGF), y la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Algunos de estos receptores están implicados en la patogénesis de enfermedades tumorigénicas, tales como, por ejemplo, los receptores de la familia EGF, que pueden estar sobreexpresados en ciertos tipos de cáncer, tales como, por ejemplo, cáncer de mama. Así, los vectores pseudotipificados de esta invención pueden dirigirse a células cancerosas a través de los receptores de EGF utilizando anticuerpos monocatenarios dirigidos al receptor de EGF o el EGF como ligando. En otra realización, las partículas de vector lentivírico de la invención dirigidas a RTK pueden utilizarse para detectar, transducir, seleccionar y/o aislar poblaciones de células o células que portan RTK.
- En otra realización preferida, la proteína H de MeV se selecciona del grupo que consiste en una proteína de fusión de Hmut Δ 14, Hmut Δ 15, Hmut Δ 16, Hmut Δ 17, Hmut Δ 18, Hmut Δ 19, Hmut Δ 20, Hmut Δ 21+4, o Hmut Δ 24+4A, y un anticuerpo monocatenario o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio, en la que el anticuerpo monocatenario se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo o un ligando dirigido contra o que se une a CD4, CD8, CD34, CD20, CD19, CD33, CD133, EGF-R y VEGFR-2 (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-2). La proteína F de MeV puede ser, por ejemplo, Fc Δ 30 o Fc Δ 24.
- Los ligandos pueden ser factores del crecimiento tales como, entre otros, factor de células pluripotenciales (SCF), factor del crecimiento nervioso (NGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), y factor del crecimiento de hepatocitos (HGF); citoquinas, tales como, por ejemplo, eritropoyetina, hormona del crecimiento y todos los tipos de interleuquinas; quimioquinas CC y CXC; y pueden ser hormonas polipeptídicas y peptídicas.
- En otra realización, la proteína H es una fusión de Hmut Δ 18, Hmut Δ 19 o Hmut Δ 24+4A y un anticuerpo monocatenario o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio.
- En otra realización, el anticuerpo monocatenario se dirige contra los marcadores celulares CD20 (scFvCD20), CD34 (scFvCD34), VEGFR-2 (scFvA7), CD133 (scFvCD133), o el ligando es EGF (el ligando del receptor de EGF).
- En otra realización, la proteína H es una fusión de Hmut Δ 18, Hmut Δ 19 o Hmut Δ 24+4A condensado a scFvCD20, scFvCD34, scFvA7, EGF o scFvCD133, y la proteína F es Fc Δ 30 o Fc Δ 24. En otra realización preferida, la proteína H truncada se define mediante la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.
- En otra realización, la invención se dirige a una molécula de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico se define mediante la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. Preferiblemente, dicha

molécula de ácido nucleico es parte de un plásmido o un plásmido de expresión.

En otra realización preferida, la partícula de vector lentivírico de la invención comprende además un vector de expresión de ARN psi-positivo. Preferiblemente, el vector de expresión de ARN psi-positivo comprende al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que codifica un gen de resistencia a antibióticos, un gen que codifica ARNsi, un gen que codifica ARNsh, un gen que codifica un factor angiogénico, un gen que codifica un factor apoptótico, un gen que codifica un factor citotóxico, un gen que codifica un factor antiapoptótico, un gen que codifica un factor neuroprotector, un gen que codifica un antígeno vírico o bacteriano, un gen que codifica una proteína antivírica, un gen que codifica un antígeno tumoral, un gen que codifica un factor inmunoestimulador, y una copia funcional de un gen defectuoso o mutado en un paciente que padece una enfermedad heredada. En una realización aún más preferida, dicho gen se selecciona del grupo que consiste en un gen que codifica GFP, un gen que codifica eGFP, un gen que codifica una proteína inductora de la apoptosis, un gen que codifica una proteína citotóxica, un gen TNF- α , un gen p53, un ARN de interferencia, un gen de interferón, y un gen que codifica una proteína inmunoestimuladora.

En otra realización, la invención se dirige a métodos para producir las partículas de vector lentivírico de la invención.

Se describe un método para producir una partícula de vector lentivírico pseudotipificado, comprendiendo dicho método: cotransfectar una línea celular encapsulante con un gen gag/pol lentivírico psi-negativo, un vector de expresión lentivírico psi-positivo, y uno o dos vectores de expresión psi-negativos que codifican las proteínas H y F de morbillivirus truncadas, en el que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos 1 resto aminoácido de carga positiva, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir una pseudotipificación eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión. Preferiblemente, el morbillivirus es un virus del sarampión, o la cepa Edmonston del virus del sarampión.

Se describe que la porción citoplásmica truncada de la proteína H puede comprender al menos 9 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica C-terminal de la proteína H, más una metionina adicional en el N-terminal; la porción citoplásmica truncada de la proteína F puede comprender al menos 3 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica N-terminal de la proteína F, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H puede comprender al menos 13 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica C-terminal de la proteína H, más una metionina adicional en el N-terminal, pudiendo estar de uno a cuatro de los restos aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 restos aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica C-terminal de la proteína H reemplazados por restos alanina.

En otra realización preferida, el vector de expresión lentivírico psi-positivo y/o el gen gag/pol lentivírico psi-negativo se derivan de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV.

En otra realización preferida, dichos uno o dos vectores de expresión psi-negativos codifican una proteína F truncada Fc Δ 24 o Fc Δ 30 y/o codifican la proteína H truncada seleccionada del grupo que consiste en Hc Δ 14, Hc Δ 15, Hc Δ 16, Hc Δ 17, Hc Δ 18, Hc Δ 19, Hc Δ 20, Hc Δ 21+A y Hc Δ 24+4A.

En otra realización preferida, el vector de expresión psi-negativo que codifica la proteína H truncada codifica una proteína H que es una proteína quimérica que no interacciona con CD46 ni SLAM, y que además presenta un anticuerpo monocatenario, un factor del crecimiento o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio.

En otra realización preferida, el anticuerpo monocatenario o el ligando se dirige contra o se une a un marcador de un cúmulo de diferenciación (CD), un antígeno tumoral expuesto sobre la superficie celular, un receptor de tirosina quinasa, un receptor de quimioquina, un receptor acoplado a proteína G, un receptor olfativo, una proteína vírica expuesta sobre la superficie de células crónicamente infectadas, un receptor de neurotransmisores, un factor de células pluripotenciales, un factor del crecimiento, un factor del crecimiento nervioso, un factor del crecimiento epidérmico, un factor del crecimiento endotelial vascular, un factor del crecimiento de hepatocitos, un receptor de interleuquina y/o un receptor de citoquina. Aún más preferiblemente, el anticuerpo monocatenario o el ligando se dirige contra o se une a una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD4, CD8, CD34, CD20, CD19, CD33, CD133, EGF-R y VEGFR-2, mucina-1, el receptor de dopamina, el receptor de acetilcolina, el receptor GABA, EGF-R, VEGFR-2, la proteína gp120 de VIH, (HGF) y eritropoyetina. Aún más preferiblemente, la proteína H truncada se define mediante la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.

En otra realización preferida, el vector de expresión lentivírico psi-positivo comprende al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que codifica un gen de resistencia a antibióticos, un gen que codifica ARNsi, un gen que codifica ARNsh, un gen que codifica un factor angiogénico, un gen que codifica un factor apoptótico, un gen que codifica un factor citotóxico, un gen que codifica un factor antiapoptótico, un gen que codifica un factor neuroprotector, un gen que codifica un antígeno vírico o bacteriano, un gen que codifica una proteína antivírica, un gen que codifica un antígeno tumoral, un gen que codifica un factor inmunoestimulador, y una copia funcional de un gen defectuoso o mutado en un paciente

que padece una enfermedad heredada. Preferiblemente, el gen se selecciona del grupo que consiste en GFP, eGFP, proteína inductora de la apoptosis, o un gen que codifica una proteína citotóxica, que incluyen, entre otros, el gen TNF- α , el gen p53, un ARN de interferencia, un gen de interferón, y un gen que codifica una proteína inmunoestimuladora.

- 5 En otra realización preferida, la línea celular encapsulante expresa de modo estable uno o más de los genes codificados por un gen gag/pol lentivírico psi-negativo, un vector de expresión lentivírico psi-positivo, o uno o dos vectores de expresión psi-negativos que codifican las proteínas H y F del virus del sarampión truncadas.

10 En otra realización preferida, la cantidad del plásmido que codifica la proteína F truncada utilizada para la cotransfección durante la producción de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado es mayor que la cantidad del plásmido que codifica la proteína H truncada utilizada para la cotransfección. Preferiblemente, la cantidad del plásmido que codifica la proteína F truncada es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500% mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, es más del 1000% mayor, y lo más preferiblemente es 700% mayor que la cantidad del plásmido que codifica la proteína H truncada.

15 En resumen, la presente invención se basa en el descubrimiento inesperado y sorprendente de que la incorporación de proteínas F y H de morbillivirus, preferiblemente MeV, que tienen colas citoplásmicas truncadas, en partículas de vector lentivírico, y la compleja interacción de estas dos proteínas durante la fusión celular, permite una transducción de células mejor y más eficaz. Además, estas partículas de vector pseudotipificado permiten la transferencia de genes dirigida a un tipo celular concreto de interés mediante la modificación de una proteína H truncada y mutada con un anticuerpo monocatenario o un ligando dirigido contra un marcador de la superficie celular de la célula diana.

20 III. Composiciones farmacéuticas basadas en las partículas de vector lentivírico de la presente invención

1. Formulaciones y vías de administración

25 Las composiciones farmacéuticas basadas en las partículas de vector lentivírico de la presente invención pueden formularse de cualquier manera convencional utilizando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Así, las partículas de vector lentivírico de la presente invención pueden formularse para la administración, por ejemplo, mediante inyección, inhalación o aislación (a través de la boca o de la nariz), o mediante administración oral, bucal, parenteral o rectal.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para una diversidad de modos de administración, que incluyen la administración sistémica, tópica o localizada. Las técnicas y las formulaciones pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa. Para la administración sistémica se prefiere la inyección, que incluye la inyección intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para ser inyectadas, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en disoluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hank o disolución de Ringer. Además, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes del uso. También son adecuadas las formas liofilizadas de la composición farmacéutica.

35 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tomar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes ligantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, o bifosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos también pueden revestirse mediante métodos muy conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Estas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes suspensores (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa, o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulgentes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil- o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). La preparación también puede contener sales tamponantes, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para la inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante opcionalmente añadido. Las composiciones farmacéuticas también pueden formularse como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener otros agentes, que incluyen agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

55 Además, las composiciones farmacéuticas también pueden formularse como una preparación depot (preparación con depósito de liberación lenta). Estas formulaciones de acción a largo plazo pueden administrarse mediante

5 implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular), o mediante una inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Otros sistemas de administración adecuados incluyen microesferas, que ofrecen la posibilidad de la administración no invasiva local de fármacos a lo largo de un periodo extendido de tiempo. Esta tecnología puede incluir microesferas que tengan un tamaño precapilar, que pueden inyectarse a través de un catéter coronario hacia cualquier parte seleccionada de un órgano sin provocar inflamación o isquemia. El producto terapéutico administrado después es liberado lentamente desde las microesferas y absorbido por las células circundantes presentes en el tejido seleccionado.

10 La administración sistémica también puede ser por medios transmucósicos o transdérmicos. Para la administración transmucósica o transdérmica, en la formulación se emplean penetrantes apropiados para la barrera que va a ser permeada. Estos penetrantes son conocidos en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucósica, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Además, pueden utilizarse detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucósica puede producirse utilizando pulverizados nasales o supositorios. Para la administración tópica, las partículas de vector de la invención pueden formularse en ungüentos, bálsamos, geles o cremas, tal como se conoce en general en la técnica. También puede utilizarse una disolución de lavado de modo local para tratar una lesión o una inflamación para acelerar la curación.

20 En otra realización, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende las partículas de vector pseudotipificado de la presente invención, o el uso de las partículas de vector pseudotipificado de la presente invención para la preparación de un medicamento. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende también un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Uso de las composiciones farmacéuticas

25 Las composiciones farmacéuticas basadas en las partículas de vector pseudotipificado dirigido a la entrada en la célula de la presente invención son útiles para transducir una célula establecida específicamente como diana, que puede incluir, entre otras, una célula cancerosa o una célula pluripotencial, con el producto génico de una proteína deseada que, si se expresa en la célula diana, conduce a la prevención o al tratamiento de un trastorno médico concreto.

30 Como ejemplo, se ha demostrado recientemente que CD133 es un marcador celular importante que aparece sobre las células cancerosas. Así, por ejemplo, una célula de carcinoma de riñón (renal) que expresa CD133 puede ser establecida como diana con facilidad para las partículas de vector pseudotipificado dirigido a la entrada en la célula de la presente invención, en las que la proteína H se fusiona con un anticuerpo monocatenario dirigido a CD133 (scFvCD133). Además, el gen que se va a transducir en las células de carcinoma renal diana puede ser, por ejemplo, un gen que codifica un gen de anticuerpo deseado (o uno de sus fragmentos). Así, el producto de la expresión del transgén puede unirse a las proteínas intracelulares, por ejemplo, derivadas de oncogenes, para así infrarregular la expresión de proteínas oncogénicas. Además, el gen que se va a transducir en las células de carcinoma renal diana puede codificar una proteína inductora de la apoptosis o una proteína citotóxica que incluye, entre otras, TNF- α , p53, un ARN de interferencia, una proteína inmunoestimuladora y/o un gen que codifica productos génicos citostáticos, inductores de la apoptosis y/o citotóxicos.

40 En otra realización, las partículas de vector pseudotipificado utilizadas para la preparación de un medicamento comprenden un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que codifica un gen de resistencia a antibióticos, un gen que codifica ARNs, un gen que codifica ARNs, un gen que codifica un factor angiogénico, un gen que codifica un factor apoptótico, un gen que codifica un factor citotóxico, un gen que codifica un factor antiapoptótico, un gen que codifica un factor neuroprotector, un gen que codifica un antígeno vírico o bacteriano, un gen que codifica una proteína antivírica, un gen que codifica un antígeno tumoral, un gen que codifica un factor inmunoestimulador, una copia funcional de un gen defectuoso o mutado en un paciente que padece una enfermedad heredada, un gen que codifica una proteína citotóxica, que incluye, entre otras, TNF- α , p53, ARN de interferencia, interferón, y una proteína inmunoestimuladora y/o un gen que codifica productos génicos citostáticos, inductores de la apoptosis y/o citotóxicos, en el que el gen se va a transducir en la célula diana y será expresado por esta.

50 Una ventaja significativa de las composiciones farmacéuticas basadas en las partículas de vector de la presente invención es que, debido a su alta especificidad por una célula diana concreta, la cantidad de la composición farmacéutica que debe administrarse al paciente puede proporcionarse así en una cantidad ajustada. Por ejemplo, en las terapias del cáncer, una composición farmacéutica basada en partículas de vector que comprenden un gen que codifica productos génicos citostáticos, inductores de la apoptosis y/o citotóxicos puede así administrarse por vía sistémica al paciente y, debido a la alta especificidad de las partículas de vector, la concentración de la composición farmacéutica en el sitio de las células diana, por ejemplo, el tumor tratado, es tal alta o aún más alta que la concentración en una situación en la que los productos génicos citostáticos, inductores de la apoptosis y/o citotóxicos se administran directamente de un modo sistémico. Así, la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que provoca la formación de productos génicos citostáticos, inductores de la apoptosis y/o citotóxicos en el sitio del tratamiento puede mantenerse a un nivel significativamente menor que si los productos génicos citostáticos,

inductores de la apoptosis y/o citotóxicos se administrasen directa y sistémicamente. Como puede observarse, la posibilidad de efectos graves y adversos de los productos génicos citostáticos, inductores de la apoptosis y/o citotóxicos puede disminuir significativamente o incluso evitarse.

5 En otra realización, la invención se dirige al uso de las partículas de vector de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer, que incluye, pero no se limita a neoplasmas, tumores, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno que se caracterice por un crecimiento celular descontrolado, y en particular sus formas resistentes a múltiples fármacos. Los ejemplos de tipos de cáncer y trastornos proliferativos que se pueden tratar con los productos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a leucemia (por ejemplo, leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), y leucemia linfocítica crónica), linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no hodgkiniana), fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, hepatoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, displasia e hiperplasia. En una realización particular, los compuestos terapéuticos de la invención se administran a pacientes que tienen cáncer de próstata (por ejemplo, prostatitis, hipertrofia prostática benigna, hiperplasia prostática benigna (BPH), paraganglioma prostático, adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, fistulas prostato-rectales, y lesiones estromáticas prostáticas atípicas). El tratamiento y/o la prevención del cáncer incluye, pero no se limita a aliviar los síntomas asociados con el cáncer, la inhibición del avance del cáncer, la estimulación de la regresión del cáncer, y la estimulación de la respuesta inmunológica.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con otros tipos de estrategias de tratamiento del cáncer (por ejemplo, terapia de radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y agentes antitumorales). Los ejemplos de agentes antitumorales incluyen, pero no se limitan a cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-11, topotecano, 9-AC, y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal, y taxol.

30 En otra realización, la invención se dirige al uso de las partículas de vector pseudotipificado descritas en la presente para la preparación de un medicamento. En otra realización, la invención se dirige al uso de las partículas de vector pseudotipificado de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de al menos un trastorno en un sujeto, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una infección crónica, la inmunodeficiencia SCID-X1¹⁸, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, VIH, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes, una enfermedad neuroinflamatoria, una enfermedad reumática, una enfermedad autoinmunitaria, adipositas, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica, carcinoma renal. En otra realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), y leucemia linfocítica crónica, linfoma, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no hodgkiniana, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, hepatoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, displasia e hiperplasia, cáncer de próstata, prostatitis, hipertrofia prostática benigna, hiperplasia prostática benigna (BPH), paraganglioma prostático, adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, fistulas prostato-rectales, y lesiones estromáticas prostáticas atípicas.

45 Otros trastornos médicos que pueden tratarse con el vector lentivírico pseudotipificado de esta invención se refieren a todos los tipos de enfermedades que están relacionadas con el sistema hematopoyético. En este caso, el vector pseudotipificado puede utilizarse para la transferencia de genes selectiva en células pluripotenciales hematopoyéticas (HSC) o células precursoras. Para la transferencia de genes selectiva en HSC, se presenta el factor de células pluripotenciales (SCF) o un anticuerpo monocatenario dirigido contra CD34 sobre la proteína H. Con estos vectores, el gen terapéutico puede trasladarse e insertarse de modo estable en el genoma de HSC de forma que esté presente y se exprese en cualquier tipo celular que se diferencie de las HSC transducidas. Para la transducción pueden utilizarse células de médula ósea o células de leucaféresis sin necesidad de purificar las HSC, lo cual resulta necesario cuando se emplean vectores retrovíricos no dirigidos convencionales. Como alternativa, con estos vectores dirigidos es posible una aplicación *in vivo* a la médula ósea del paciente. Los tipos de enfermedades que pueden tratarse mediante esta estrategia incluyen, pero no se limitan a enfermedades hereditarias monogénicas, tales como inmunodeficiencias, por ejemplo, SCID-X1. En SCID-X1, el vector pseudotipificado transferirá el gen del receptor de interleuquina yc que está mutado a los pacientes. Además también pueden tratarse enfermedades infecciosas, tales como SIDA, de esta manera. En este caso, los genes antivíricos que codifican, por ejemplo, un ARN inhibidor (ARNi) específico del VIH, o inhibidores de la entrada a la célula, tales como T20 unido a la membrana, se encapsularán en el vector pseudotipificado. Como alternativa, puede realizarse una transferencia de genes dirigidos a SIDA, en la que anticuerpos específicos para la proteína gp120 de VIH, que está expuesta sobre la superficie celular de las células infectadas por VIH, se muestran sobre las partículas de vector.

Encapsulados junto con genes suicidas, estos vectores matan selectivamente las células infectadas por VIH cuando se administran por vía sistémica a los pacientes.

El hígado es un órgano muy adaptado para la producción de factores solubles de la sangre. En pacientes hemofílicos, los factores de coagulación, tales como el factor VIII o el factor IX, están enzimáticamente inactivos debido a mutaciones en los correspondientes genes, que resultan en el fracaso de la coagulación de la sangre y sangrados frecuentes. Una estrategia de terapia génica contra la hemofilia requiere una transferencia eficaz de una copia funcional del gen defectuoso hacia el hígado de pacientes hemofílicos. Esto puede lograrse utilizando un vector lentivírico pseudotipificado, en el que la proteína H presenta un anticuerpo monocatenario dirigido contra un marcador de la superficie de células hepáticas, tal como, por ejemplo, el receptor del factor del crecimiento de hepatocitos o el receptor de asialoglicoproteínas. Este vector después puede equiparse con una copia funcional del gen del factor VIII o del factor IX, y administrarse a pacientes hemofílicos a través de la vena porta hepática. De forma similar, el hígado puede utilizarse para la producción de inmunoglobulinas mediante esta estrategia, si la información genética para una inmunoglobulina concreta, por ejemplo, dirigida contra un agente infeccioso, se encapsula en el vector pseudotipificado.

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos, es decir, células capaces de mantener complejos de antígeno-anticuerpo durante un largo periodo de tiempo, que están implicadas en la defensa inmunológica del cuerpo. Las células dendríticas se diferencian a partir de los monocitos. En especial para las estrategias de vacunación contra el cáncer, las células dendríticas son el tipo de célula elegido para la expresión de antígenos tumorales. La transferencia de genes *in vivo* de estas células puede lograrse con un vector lentivírico pseudotipificado que muestra un anticuerpo monocatenario dirigido contra CD14 (para monocitos) o CD83 (para células dendríticas). Los vectores lentivíricos de tipo SIVpbj o VIH-2 se emplean para esta aplicación, puesto que permiten una transferencia eficaz del vector que codifica el antígeno tumoral hacia los monocitos en reposo.

Las propiedades exclusivas de los vectores lentivíricos pseudotipificados de esta invención, es decir, el transporte de genes hacia células en reposo y el transporte dirigido a la entrada en la célula, serán de especial importancia para el tratamiento de muchos tipos de enfermedades neurodegenerativas que requieren el transporte de genes que codifican factores antiapoptóticos o neuroprotectores hacia subpoblaciones definidas de neuronas. La enfermedad de Parkinson, por ejemplo, resulta de la pérdida de células secretoras de dopamina pigmentadas (dopaminérgicas) y la posterior pérdida de melanina, segregada por las mismas células, en la región de la pars compacta de la sustancia negra. Estas neuronas se proyectan hacia el cuerpo estriado, y su pérdida conduce a alteraciones en la actividad de los circuitos neurales dentro de los ganglios basales que regulan el movimiento, en esencia, una inhibición de la vía directa y la excitación de la vía indirecta. La vía directa facilita el movimiento y la vía indirecta inhibe el movimiento, así la pérdida de estas células conduce a un trastorno del movimiento hipocinético. La falta de dopamina produce una mayor inhibición del núcleo lateral ventral del tálamo, que envía proyecciones excitatorias a la corteza motora, conduciendo así a una hipoquinesia. Para el tratamiento, el vector lentivírico pseudotipificado de esta invención presenta un anticuerpo monocatenario dirigido contra el receptor de dopamina y que tiene genes terapéuticos que codifican, por ejemplo, factores antiapoptóticos o neuroprotectores encapsulados. En otra realización, las partículas de vector lentivírico de la invención pueden utilizarse para la transferencia de genes hacia células, preferiblemente células en reposo y para aplicaciones de terapia génica.

Una enfermedad cardiovascular se refiere a la clase de enfermedades que implican al corazón y/o los vasos sanguíneos (arterias y venas). Los síntomas y tratamientos dependen de cuál conjunto (o conjuntos) de arterias están afectadas. En la enfermedad cardíaca coronaria, las placas ateroscleróticas (depósitos grasos inflamados en la pared de los vasos sanguíneos) obstruyen las arterias coronarias (los vasos sanguíneos que suministran al corazón). Cuando el bloqueo se convierte en suficientemente grave, el flujo sanguíneo al corazón se ve restringido (isquemia cardíaca), en especial durante un aumento en la demanda (es decir, durante un ejercicio o emoción), lo cual provoca una angina de pecho. El infarto de miocardio se produce cuando una de las placas se rompe, formando un trombo (coágulo de sangre) que ocluye agudamente la arteria completa. Esto puede provocar la muerte del paciente si el área afectada es lo suficientemente grande. En la enfermedad de las arterias periféricas, la obstrucción se produce en las arterias de los brazos o las piernas. Esto provoca inicialmente dolor, durante la obstrucción temporal, y por último la muerte del tejido y gangrena si no se trata. Existen muchas enfermedades específicas que pueden producirse en asociación con estas y otras enfermedades cardiovasculares. Además de las mencionadas anteriormente, estas incluyen hipertensión (alta presión sanguínea), aneurismas arteriales (agrandamiento y debilitamiento arterial), cardiomegalia (agrandamiento anómalo del corazón), taquicardia/bradicardia/arritmia (frecuencia cardíaca rápida/lenta/irregular), parada cardíaca (detención del corazón), cardiomiopatía (debilitamiento del músculo cardíaco), regurgitación de válvulas cardíacas (filtración), y estenosis de válvulas cardíacas (estrechamiento). Los vectores lentivíricos pseudotipificados de esta invención pueden utilizarse para el tratamiento tras su aplicación *in vivo* al sitio de la arteria afectada. Como se dirige a CD133 (células precursoras endoteliales) o al receptor de VEGF (expresado sobre células endoteliales activadas), el vector transfiere selectivamente genes terapéuticos que codifican factores que estimulan la angiogénesis directa (por ejemplo, VEGF, FGF) o indirectamente (por ejemplo, óxido nítrico sintasa endotelial), lo cual conduce al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que esquivan el flujo sanguíneo bloqueado. En otra realización, las partículas de vector lentivírico de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

En otra realización, la invención se dirige al uso de las partículas de vector pseudotipificado de la invención para la

preparación de un medicamento. En una realización preferida, la invención se dirige al uso de las partículas de vector pseudotipificado de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer, infecciones crónicas, tales como, por ejemplo, SIDA, enfermedades monogenéticas hereditarias, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. En una realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia, leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), y leucemia linfocítica crónica, linfoma, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no hodgkiniana, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, hepatoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, displasia e hiperplasia, cáncer de próstata, prostatitis, hipertrofia prostática benigna, hiperplasia prostática benigna (BPH), paraganglioma prostático, adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, fístulas prostato-rectales, y lesiones estromáticas prostáticas atípicas.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran solas o en combinación con otros tipos de tratamiento del cáncer.

IV. Selección de anticuerpos empleando las partículas de vector lentivírico de la presente invención

Los bancos de presentación de fagos representan una metodología bien establecida para la selección de anticuerpos. Son especialmente útiles para la selección frente a antígenos inmovilizados sobre plástico purificados. Sin embargo, la selección frente a células completas o membrana celulares presenta más problemas. Por ejemplo, la selección en animales vivos es imposible utilizando anticuerpos presentados por fagos. Otra limitación conocida de los bancos de fagos es la expresión y selección de anticuerpos en un entorno procariota. Por tanto, se sabe que con frecuencia se producen problemas de traducción cuando se pretende utilizar anticuerpos seleccionados con fagos para cualquier tipo de uso terapéutico.

La presente invención proporciona también un método para un sistema de selección basado en virus de mamíferos, que permite la selección de anticuerpos deseada en un sistema de mamífero o humano. De modo más importante, y en contraste con todas las plataformas de selección de anticuerpos conocidas, el sistema descrito acopla el contacto del anticuerpo-antígeno directamente con la infección o la transferencia de genes. Por tanto, un único acontecimiento de unión será suficiente para la detección de la señal del anticuerpo.

El transporte dirigido mediado por scFv de las partículas de vector de la presente invención proporciona dicho sistema de selección de anticuerpos basado en virus deseado. Mediante la sustitución de un scFv diferenciado en los variantes de proteína H de MeV por un banco de ScFv, puede producirse un banco de partículas de vector de VIH/MeV. Las partículas de vector contenidas dentro de este banco están equipadas con un vector de transferencia biscistrónico que codifica el variante de H-scFv además de un marcador de selección que incluye, por ejemplo, la resistencia a neomicina. Así, las partículas de vector que entran en las células diana a través de una interacción de anticuerpo-antígeno integrarán de modo estable su información genética en la célula, que después puede seleccionarse y amplificarse bajo condiciones de neomicina. La información genética para el anticuerpo seleccionado entonces puede clonarse con facilidad a partir de las células resistentes a neomicina.

El sistema de banco descrito en la presente es más deseable para la selección de anticuerpos para un uso terapéutico o de transporte dirigido que los bancos de fagos conocidos. Además, el diseño de métodos de selección concretos es más flexible para este uso terapéutico o de transporte dirigido que con las metodologías de fagos.

Así, la presente invención describe un método para seleccionar anticuerpos en un sistema de mamífero, en el que se proporciona un banco de partículas de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una pluralidad de grupos de diferentes partículas de vector lentivírico pseudotipificado, en el que las partículas de vector tienen, cada una, una proteína F y H truncada de la invención. Además, la proteína H truncada generalmente es una proteína quimérica que no interacciona con CD46 o SLAM, y también contiene un anticuerpo monocatenario en su ectodominio (tal como se explicó anteriormente). Además, los diversos grupos de diferentes partículas de vector incluidos en el banco se diferencian en los anticuerpos monocatenarios que están fusionados con el ectodominio de su proteína H.

Además, cada una de las partículas de vector de un grupo concreto de partículas de vector comprende un vector de expresión lentivírico biscistrónico que codifica (a) el anticuerpo monocatenario que está fusionado con la proteína H del respectivo grupo de partículas de vector, y (b) un gen indicador expresable. Esto significa que cada partícula de vector de un grupo concreto porta la información genética para el anticuerpo que está fusionado con sus proteínas H truncadas y, además, proporciona un medio para transducir la célula diana con la información genética del gen indicador. "Expresable" significa que, tras la transducción, el gen indicador será expresado por la célula diana, es decir, que la información genética completa está presente y conduce a la expresión del gen indicador (entre otros, regiones de promotor reconocidas por la célula diana).

Una población de células que expresan un marcador conocido o desconocido puede seleccionarse utilizando las

partículas de vector del presente banco; las partículas de vector lentivírico pseudotipificado entonces transducirán solo las células que expresan un marcador sobre su superficie que se corresponda con el anticuerpo monocatenario fusionado con la proteína H truncada que porta la partícula de vector. Por consiguiente, estas células, tras la transducción, portarán la información genética de (a) el anticuerpo monocatenario que está fusionado con la proteína H de la respectiva partícula de vector, y (b) el gen indicador expresable. Puesto que el gen indicador expresable entonces es expresado por la célula transducida, el indicador actúa así como un medio para seleccionar las células que han sido transducidas y, como resultado, portan la información genética del anticuerpo monocatenario unido al correspondiente marcador sobre la superficie de la célula transducida.

Como ejemplo, el gen indicador expresable puede codificar el gen de resistencia a neomicina u otros genes de resistencia a antibióticos, pero también marcadores fluorescentes, tales como GFP, eGFP o marcadores celulares detectables por anticuerpos, lo cual permite, entre otros, la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) de las células transducidas. Así, en el caso de que el gen indicador expresable codifique la resistencia a neomicina, las células transducidas pueden entonces seleccionarse mediante una incubación con neomicina, que conduce a la destrucción de todas las células no transducidas y, así, susceptibles a neomicina. Por consiguiente, solo quedan las células que han sido transducidas y que, por tanto, portan y expresan el gen de resistencia a neomicina.

En una etapa posterior, el contenido genético del anticuerpo monocatenario de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado que ha transducido la célula y, así, ha conferido la resistencia a neomicina, puede determinarse a partir de las células resistentes a neomicina. Esta determinación generalmente se realiza mediante protocolos de secuenciación conocidos. Como ejemplo, pueden utilizarse cebadores que se correspondan con una secuencia universal introducida en el banco de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, por ejemplo, dentro de la región o en la porción C-terminal de la proteína H adyacente a la región de fusión de la proteína H y el anticuerpo monocatenario. Como otro ejemplo, se puede utilizar la secuencia de un marcador-HIS, que en general se añade a todas las construcciones de fusión que comprenden la proteína H y el anticuerpo monocatenario de dicho banco, para la generación de estos cebadores.

La población de células que se selecciona utilizando las partículas de vector lentivírico pseudotipificado puede expresar un marcador celular conocido o un marcador celular desconocido. En el caso de un marcador conocido, la población de células puede expresar el marcador celular en la naturaleza. Este es el caso, por ejemplo, si la selección se realiza para una línea celular específica o para células derivadas de una biopsia de cáncer que se sabe que expresan un marcador celular concreto. En estos casos, la selección se dirigirá a la determinación de nuevos anticuerpos para estos marcadores que puedan mostrar propiedades nuevas y/o mejoradas. Sin embargo, no es necesario que el marcador presente sobre la población de las células sometidas a la selección de la presente invención sea conocido. Como ejemplo, una población celular derivada de la biopsia de un cáncer desconocido o lesión puede seleccionarse utilizando esta técnica. En estos casos, la selección se dirigirá a determinar cualquier anticuerpo nuevo que pueda utilizarse, por ejemplo, para la clasificación y el tratamiento de dicho cáncer o lesión.

Las células sometidas a la selección después pueden expresar los marcadores de forma transitoria o estable. Esto significa que los anticuerpos para un marcador concreto y conocido pueden ser específicamente seleccionados. Esto resultará de particular interés para proteínas de membrana que son difíciles de purificar y que también resulte difícil generar anticuerpos contra ellas por métodos convencionales. Como ejemplo, una línea celular de mamífero, por ejemplo, células CHO o HT1080, se transfecta de modo estable para que exprese un marcador específico, por ejemplo, un marcador CD20 humano. Después, la línea celular transfectada de modo estable que expresa CD20 se selecciona utilizando el banco de partículas de vector lentivírico pseudotipificado para determinar los anticuerpos dirigidos contra CD20 humano. Otros marcadores celulares que pueden someterse a una selección incluyen, sin limitación, todos los marcadores de cúmulos de diferenciación (CD), tales como, por ejemplo, CD4, CD8, CD19, CD20, CD33, CD34, CD133, antígenos tumorales expuestos sobre la superficie celular, tales como, por ejemplo, mucina-1, moléculas de la superficie de células del sistema nervioso, tales como, por ejemplo, receptores de neurotransmisores, tales como los receptores de acetilcolina o GABA, receptores de factores del crecimiento, tales como, por ejemplo, EGF-R y VEGFR-2, receptores olfativos, y receptores acoplados a proteína G, así como proteínas víricas expuestas sobre la superficie de células crónicamente infectadas, tales como, por ejemplo, la proteína gp120 del VIH.

En otra realización, la invención se dirige a un método para seleccionar anticuerpos en un sistema de mamífero, que comprende: (a) proporcionar un banco de partículas de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una pluralidad de diferentes partículas de vector lentivírico pseudotipificado según la invención, en el que las proteínas H truncadas de las partículas lentivíricas pseudotipificadas tienen un anticuerpo monocatenario diferente en su ectodominio, y las partículas comprenden también un vector de expresión lentivírico bistrónico, en el que dicho vector de expresión codifica el anticuerpo monocatenario de la respectiva partícula lentivírica pseudotipificada y un gen indicador expresable; (b) poner en contacto una población de células que expresan un marcador celular con el banco de la etapa (a), bajo condiciones que permiten la transducción de las células por dichas partículas de vector; (c) seleccionar células que expresan el gen indicador expresable transducido por una partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a); y (d) determinar la información genética del anticuerpo monocatenario de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado que transduce la célula a partir de las células seleccionadas de la etapa (c).

En una realización preferida, el gen indicador expresable es un gen que codifica un producto génico seleccionado del grupo de un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que confiere resistencia a antibióticos, neomicina GFP y eGFP.

5 En otra realización preferida, la población de células expresa en la naturaleza el marcador celular, el antígeno o el receptor, o la población de células ha sido transfectada de modo transitorio o estable para que exprese dicho marcador celular, antígeno o receptor.

En otra realización preferida, el marcador celular, antígeno o receptor se selecciona del grupo que consiste en CD4, CD8, CD34, CD20, CD19, CD33, CD133, EGF-R y VEGFR-2.

10 En otra realización preferida, la cantidad de proteína F truncada de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado es mayor que la cantidad de proteína H truncada, preferiblemente la cantidad de proteína F truncada es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500% mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, es más del 1000% mayor, y lo más preferiblemente es 700% mayor que la cantidad de la proteína H truncada.

V. Detección, selección y/o aislamiento de células específicas utilizando las partículas de vector lentivírico de la presente invención

15 La presente invención también proporciona medios para seleccionar, detectar y/o aislar células que portan un marcador celular específico. Esto resulta especialmente deseable si, por ejemplo, se estudian tejidos o poblaciones celulares procedentes de biopsias para detectar células cancerosas. Otro ejemplo para el uso de las partículas de vector de la presente invención para la detección, selección y/o aislamiento de células específicas en el campo de la neurobiología se indica a continuación.

20 En neurobiología, los protocolos para cultivos de cortes organotípicos de cerebro de ratón están bien establecidos y permiten el cultivo de cortes completos durante varias semanas y el análisis de células individuales dentro del tejido, tal como, por ejemplo, grabaciones de electrofisiología. Hasta la fecha no existe ningún método disponible para identificar tipos definidos de neuronas en el corte de tejido bajo condiciones en vivo antes de realizar el análisis. La transducción de un gen de un marcador seleccionable con los vectores lentivíricos pseudotipificados de esta
25 invención puede marcar a una célula individual basándose en la expresión de un marcador de la superficie celular elegido que se emplea para la transferencia de genes.

Utilizando las partículas de vector lentivírico de la presente invención se pueden identificar, por ejemplo, neuronas positivas al receptor AMPA en cultivos de cortes del hipocampo. Para ese fin se genera un vector lentivírico pseudotipificado que muestra un scFv dirigido contra el receptor de glutamato-1 (GluR-1) y que también presenta un
30 vector de expresión que comprende el gen GFP. Los cultivos de cortes de hipocampo después pueden inocularse con dicha partícula de vector lentivírico y puede observarse la tinción de GRP para identificar las neuronas positivas al receptor AMPA.

35 En otra realización, la invención se dirige a un método para la detección o la selección de células que expresan un marcador celular específico, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la invención, en el que la proteína H truncada de dicha partícula de vector presenta un anticuerpo monocatenario o un ligado con dicho marcador celular específico en su ectodominio, y dicha partícula de vector comprende además un vector de expresión, en el que dicho vector de expresión codifica un gen indicador expresable; (b) poner en contacto la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a) con al menos una
40 célula bajo condiciones que permiten la transducción de al menos una célula por dicha partícula de vector; y (c) detectar o seleccionar la célula o células que expresan el gen indicador expresable.

En una realización preferida, el gen indicador expresable es un gen que codifica un producto génico seleccionado del grupo de un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que confiere resistencia a antibióticos, neomicina, GFP y eGFP.

45 En otra realización preferida, la población de células expresa en la naturaleza el marcador celular, el antígeno o el receptor, o la población de células ha sido transfectada de modo transitorio o estable para que exprese dicho marcador celular, antígeno o receptor.

En otra realización preferida, el marcador celular, antígeno o receptor se selecciona del grupo que consiste en CD4, CD8, CD34, CD20, CD19, CD33, CD133, EGF-R y VEGFR-2, mucina-1, el receptor de dopamina, el receptor de acetilcolina, el receptor GABA, EGF-R, VEGFR-2, la proteína gp120 de VIH, (HGF) y eritropoyetina.

50 En otra realización preferida, la cantidad de proteína F truncada de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado es mayor que la cantidad de proteína H truncada, preferiblemente la cantidad de proteína F truncada es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500% mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, es más del 1000% mayor, y lo más preferiblemente es 700% mayor que la cantidad de la proteína H truncada.

55 VI. Identificación de un antígeno de un anticuerpo o del receptor de un ligando utilizando las partículas de vector lentivírico de la presente invención

La invención proporciona también un medio para identificar un antígeno para un anticuerpo monocatenario concreto con especificidad desconocida o el receptor para un ligando.

5 Por ejemplo, un anticuerpo monocatenario (denominado 7A5) se ha identificado previamente seleccionando un banco de presentación de fagos para la unión a la superficie de linfocitos T humanos. Aunque se ha establecido que su antígeno está presente sobre la superficie de linfocitos T humanos, pero está ausente en otros tipos de células humanas, entre las cuales se encuentran las células HEK-293T y las células HT1080, la identidad del antígeno sigue siendo desconocida.

10 Para identificar el antígeno, se generan vectores lentivíricos pseudotipificados según esta invención que muestran 7A5 sobre la proteína H. Además, se empleará un vector de transferencia bicistónico que codifica un gen de resistencia a neomicina (neo^r) y el gen GFP, de modo que las partículas de vector resultantes transfieren ambos genes de marcadores en células positivas al antígeno.

15 En la siguiente etapa, se empleará un banco de expresión de ADNc de linfocitos T que puede encapsularse en un vector de MLV, para transcribir y expresar el banco de ADNc en células HT1080 o HEK-293T. Los métodos para preparar ADNc y para construir bancos de expresión de ADNc son muy conocidos en la técnica, y cualquiera de estos métodos puede utilizarse (véase, Sambrook *et al.*, 1989). Como alternativa, los bancos de ADNc encapsulables retrovíricos de tejido de linfocitos T humanos pueden obtenerse de suministradores comerciales. Las células transducidas con el banco de ADNc después se incuban con el vector lentivírico pseudotipificado con 7A5. Las células que expresan el antígeno 7A5 en la población de células transducidas se convertirán en GFP-positivas y neor-positivas. Por tanto, estas células pueden seleccionarse con neomicina o clasificarse mediante clasificación de células activada por fluorescencia. Después, las células se amplifican en condiciones de cultivo celular convencionales. Por último, el ADNc expresado en las células seleccionadas puede clonarse y secuenciarse para identificar el antígeno 7A5 mediante una búsqueda en el banco de genes.

25 En otra realización, la invención se dirige a un método para identificar el antígeno de un anticuerpo o el receptor de un ligando, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la invención, en el que la proteína H truncada de dicha partícula de vector presenta un anticuerpo monocatenario o un ligando conocido en su ectodominio, dirigido contra un antígeno o que se une a un receptor sobre una célula, y dicha partícula de vector comprende también un vector de expresión, en el que dicho vector de expresión codifica un gen indicador expresable; (b) transcribir células con un banco de expresión de la célula de la etapa (a); (c) poner en contacto la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a) con las células transducidas de la etapa (b); (d) seleccionar las células que expresan el gen indicador expresable; y (e) determinar la información genética del antígeno o del receptor a partir de las células seleccionadas de la etapa (d). En una realización preferida, el gen indicador expresable es un gen que codifica un producto génico seleccionado del grupo de un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que confiere de resistencia a antibióticos, neomicina, GFP y eGFP.

35 En otra realización preferida, la población de células expresa en la naturaleza el marcador celular, el antígeno o el receptor, o la población de células ha sido transfectada de modo transitorio o estable para que exprese dicho marcador celular, antígeno o receptor.

En otra realización preferida, el marcador celular, antígeno o receptor se selecciona del grupo que consiste en CD4, CD8, CD34, CD20, CD19, CD33, CD133, EGF-R y VEGFR-2.

40 En otra realización preferida, la cantidad de proteína F truncada de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado es mayor que la cantidad de proteína H truncada, preferiblemente la cantidad de proteína F truncada es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500% mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, es más del 1000% mayor, y lo más preferiblemente es 700% mayor que la cantidad de la proteína H truncada.

Ejemplos

45 Materiales y métodos

Plásmidos utilizados

Plásmidos que codifican proteínas de la envuelta:

pCG-H que codifica el gen H de MV.

50 **pCG-HcΔ14** a **pCG-HcΔ24** que codifican el gen H de MV con una cola citoplásmica truncada con el número indicado de aminoácidos.

pCG-HcΔ21+A, **pCG-HcΔ24+4A**, **pCG-HcΔ26+6A** y **pCG-HcΔ30+10A** que codifican el gen H de MV con una cola citoplásmica truncada de 21, 24, 26 y 30 aminoácidos, respectivamente, y uno, cuatro, seis o diez alaninas añadidas después de la metionina de inicio de la proteína H de MV.

pCG-F que codifica el gen F de MV.

pCG-Fc Δ 24 y **pCG-Fc Δ 30** que codifican el gen F de MV con una cola citoplásmica truncada con el número indicado de aminoácidos.

5 **pCG-HmutscFvCD20 Δ 18**, **pCG-HmutscFvCD20 Δ 19** y **pCG-HmutscFvCD20 Δ 24+4A** que codifican el gen H de MV con las cuatro mutaciones puntuales Y481A, R533A, S548L, F549S, una cola citoplásmica truncada con el número indicado de aminoácidos y la secuencia de ADN de scFvCD20 condensada con la región codificadora C-terminal de la proteína Hmut Δ .

10 **pCG-HmutEGF Δ 18**, **pCG-HmutEGF Δ 19** y **pCG-HmutEGF Δ 24+4A** que codifica el gen H de MV con las cuatro mutaciones puntuales Y481A, R533A, S548L, F549S, una cola citoplásmica truncada con el número indicado de aminoácidos y la secuencia de ADN de EGF condensada con la región codificadora C-terminal de la proteína Hmut Δ .

pCG-HmutscFvGluR4 Δ 18 que codifica el gen H de MV con las cuatro mutaciones puntuales Y481A, R533A, S548L, F549S, una cola citoplásmica truncada con el número indicado de aminoácidos y la secuencia de ADN de scFvGluR4 condensada con la región codificadora C-terminal de la proteína Hmut Δ .

15 **pMDG** que codifica la glicoproteína VSV-G del virus de la estomatitis vesicular.

pHIT123 que codifica la proteína de la envuelta (Env) de MLV ecotrópico.

Plásmidos que codifican los genes gag y pol:

pCMV Δ R8.9 que codifica *gag/pol* de VIH-1.

pHIT60 que codifica *gag/pol* de MLV.

20 **SIV10+** que codifica *gag/pol* de SIV.

Plásmidos de transferencia:

pHRCMVGFP es un vector encapsulante de VIH-1 que codifica el gen indicador GFP.

pSEW es un vector encapsulante de VIH-1 que codifica el gen indicador GFP.

pSFG-eGFP es un vector encapsulante de MLV que codifica el gen indicador GFP.

25 **GAE-SFFV-GFP-WPRE** es un vector encapsulante de SIVmac que codifica el gen indicador GFP.

pS-CD34TK39-W es un vector encapsulante de VIH-1 que codifica el gen de la proteína de fusión CD34TK39.

Reacción en cadena de polimerasa

30 La reacción en cadena de polimerasa (PCR) permite amplificar secuencias de ADN específicas de diferentes orígenes, tales como ADN plasmídico, genómico o complementario (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1987). El fragmento amplificado después puede utilizarse para otros métodos biológicos moleculares. Los actuales protocolos de PCR emplean una ADN polimerasa dependiente de ADN aislada a partir de *Thermophilus aquaticus* (Taq polimerasa), que muestra un óptimo de temperatura de 72 °C. Empleando tampones, cebadores, desoxinucleótidos y condiciones de ciclación apropiados, la Taq polimerasa puede amplificar un fragmento de ADN flanqueado por las dos secuencias de cebadores. Bajo condiciones óptimas, esta amplificación se desarrolla de un modo exponencial.

35 Un ciclo de PCR típico contiene una etapa de desnaturalización a 94 °C, que conduce a la disociación del molde bicatenario. La siguiente etapa de hibridación permite el reasociado del cebador con el molde monocatenario resultante. La temperatura de hibridación T_D se ajusta según la longitud y la composición del molde de ADN. Puede calcularse aproximadamente haciéndose corresponder con la regla de Wallace (Suggs *et al.*, 1981) como sigue: $T_D = 4x(G+C) + 2x(A+T)$. Después de la hibridación, se realiza el alargamiento del ADN a 70-75 °C. El tiempo de alargamiento (t_E) se elige según la longitud del molde, aproximadamente 1 mm/1 kb de ADN. Mediante la repetición de la secuencia del ciclo, el molde se amplifica de una manera exponencial.

1x tampón de PCR (Tris 20 mM/HCl, pH 7,5; KCl 100 mM; MgCl₂ 1,5 mM; DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM; Tween 20 al 0,5%; Nonidet P40 al 0,5%; gelatina al 0,01%)

1-2 μ M del (+)-cebador y (-)-cebador, respectivamente

45 200 μ M de cada desoxinucleótido

5 unidades de Taq ADN polimerasa

ES 2 520 024 T3

0,1 µg de ADN plasmídico o genómico que contiene el fragmento de interés

Condiciones de PCR

95 °C 1 min

95 °C 30 seg

T_D °C 30 seg

72 °C t_E seg

15 ciclos

72 °C 7 min; después enfriar hasta 4 °C

Restricción y acoplamiento de ADN plasmídico

- 5 Todas las restricciones de ADN se realizaron utilizando endonucleasas de restricción disponibles en el mercado de New England Biolabs (NEB, Schwalbach, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

Reacción de restricción convencional para fines preparativos

10 µg de ADN

40 U de enzima de restricción

- 10 10 µl de 10x tampón (tampón 1-4 NEB, que se corresponde con la enzima de restricción utilizada), 10 µl de 10x BSA (NEB, solo si es necesario para la enzima aplicada)

añadir 100 µl de agua bidestilada

La muestra de restricción se incubó al óptimo de temperatura de la enzima o enzimas de restricción utilizadas durante 2 horas o durante la noche. Puesto que se emplean dos enzimas, se elige un tampón que sea adecuado para ambas enzimas.

- 15 Reacción de restricción convencional para fines analíticos

1 µg de ADN

10 U de enzima de restricción

2 µl de 10x tampón (tampón 1-4 NEB, que se corresponde con la enzima de restricción utilizada), 2 µl de 10x BSA (NEB, solo si es necesario para la enzima aplicada)

- 20 añadir 20 µl de agua bidestilada

Se realiza una incubación durante 90 min al óptimo de temperatura de la enzima o enzimas aplicadas. Se realizan digestiones dobles según se ha descrito para fines preparativos.

Acoplamiento de los fragmentos digeridos

- 25 La recombinación del ADN habitualmente se realiza mediante el acoplamiento de dos moléculas de ácidos nucleicos bicatenarios que muestran proyecciones complementarias o extremos romos. Esta reacción puede realizarse utilizando ADN ligasa T4 que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los fragmentos con consumo de ATP. Se empleó la siguiente mezcla de reacción como muestra patrón:

aproximadamente 0,3 µg de ADN (proporción molar de esqueleto a inserción = 1:3)

2 µl de tampón ligasa (NEB)

- 30 0,5 µl de ADN ligasa T4 (200 U)

añadir 20 µl de agua bidestilada

La mezcla de reacción se incubó a 16°C durante la noche.

Mutagénesis dirigida específica de sitio *in vitro* del ADN plasmídico

Una mutagénesis dirigida específica de sitio *in vitro* permite intercambiar nucleótidos deseados dentro de un

esqueleto plasmídico.

Para este fin, se empleó el kit de mutagénesis dirigida específica de sitio Stratagene Quick Change (Stratagene, La Jolla, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la extensión mediada por *Pfu* polimerasa de cebadores fosforilados, que contienen la mutación deseada. Se emplearon plásmidos superenrollados bicatenarios como molde y se desnaturalizaron a 95 °C durante 30 seg. Después, la temperatura disminuyó hasta 55 °C durante 30 segundos para permitir la reasociación de los cebadores. Después, se realizó la extensión de los cebadores a 68 °C durante 12 min. En total se realizaron 18 ciclos de reacción. Durante este procedimiento, las hebras recién sintetizadas también se acoplaron con el extremo 5' de los cebadores aplicados, debido a las ligasas termoestables presentes en la mezcla de enzimas. Como resultado, se genera un ADN circularizado que incluye las mutaciones deseadas. Después, las hebras de molde iniciales se digirieron con *DpnI*. Esta enzima corta específicamente el ADN metilado, según se aísla de las bacterias, pero no afecta a las hebras recién sintetizadas *in vitro*. Así, la mezcla de reacción puede utilizarse para la transformación de células de *E. coli* para amplificar específicamente los plásmidos mutados.

Generación de bacterias competentes y su transformación

15 La transformación de *E. coli* (cepas de seguridad derivadas de K12) es el método elegido para amplificar ADN plasmídico a través de la replicación celular. Para este objetivo, las bacterias deben pretratarse de una manera especial para que sean competentes, permitiendo así la introducción de ADN extraño.

Se emplearon 2,5 ml de un cultivo realizado durante la noche para inocular 100 ml de medio LB fresco que después se incubó a 37 °C en un agitador de bacterias. Las células se dejaron crecer hasta una DO_{560} de aproximadamente 0,5-0,55, alcanzando así la fase de crecimiento logarítmico. Después el cultivo se incubó sobre hielo durante 5 minutos, se dividió en dos porciones y se sedimentó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Después las células se resuspendieron en 20 ml de tampón TFB1 (disolución esterilizada mediante filtración de KOAc 30 mM, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glicerina al 15%, pH ajustado a 5,8 con HAc), respectivamente, se incubaron sobre hielo durante 5 minutos y de nuevo se sedimentaron como se indicó anteriormente. Después las células s resuspendieron cada una en 2 ml de tampón TFB2 (disolución esterilizada mediante filtración de MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl₂ 10 mM, glicerina al 15%, pH ajustado a 6,5 utilizando una disolución de KOH) y se incubaron sobre hielo durante 15 minutos. Después la suspensión se dividió en tubos Eppendorf de 100 µl y se congeló a -80°C.

Para la amplificación de plásmidos convencional, se realizó la transformación de las células químicamente competentes descrita anteriormente. Para este fin, las células se descongelaron sobre hielo y se añadieron aproximadamente 50 ng de ADN. Después de una posterior incubación sobre hielo durante 30 min, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 45 seg en un termobloque. Después se añadieron 500 µl de medio SOC precalentado (37 °C) (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) y la muestra se incubó durante 60 min a 37 °C. Después la suspensión de bacterias se cultivó en placas de LB-AMP (bactotriptona al 1% (en p/v), extracto de levadura al 0,5% (en p/v), NaCl al 1%, ampicilina 50 µg/ml, agar-agar al 1,5% (en p/v)).

Preparación de los plásmidos

La preparación de los plásmidos a partir de las bacterias se realizó utilizando el kit de plásmidos Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El principio básico de este método es la unión del ADN a columnas de intercambio aniónico. Así, todos los compuestos celulares, tales como proteínas, pueden lavarse, mientras que el ADN es retenido dentro de las columnas.

Para la purificación de cantidades bajas de ADN (Miniprep), se inocularon 5 ml de cultivos realizados durante la noche empleando medio LB-AMP (bactotriptona al 1% (en p/v), extracto de levadura al 0,5% (en p/v), NaCl al 1%, ampicilina 50 µg/ml). Al día siguiente, las bacterias se recolectaron a 3000 rpm durante 10 min (Minifuge RF, Heraeus, Hanau, Alemania). El sedimento resultante se lisó utilizando disoluciones suministradas por el fabricante (P1 y P2). El ADN cromosómico y los fragmentos celulares se excluyeron mediante una centrifugación (12000 rpm durante 5 ml, en una centrífuga de mesa Eppendorf). Después, el sobrenadante se aplicó a columnas de intercambio aniónico (tiras de Qiaprep-8) según el manual.

Para la extracción de mayores cantidades de ADN (Maxiprep), se inocularon 200 µl de medio LB-AMP y se cultivó durante la noche. La recolección bacteriana se realizó a 7000 rpm durante 15 min (motor JS-13.1, centrífuga J2-21; Beckman, Munich, Alemania). Después las células se lisaron y se eliminaron el restos celulares y el ADN cromosómico mediante centrifugación (10000 rpm durante 20 min). El sobrenadante resultante después se purificó en una columna de intercambio aniónico según las instrucciones del fabricante. Por último, se determinó la concentración y la pureza del ADN de modo fotométrico.

Electroforesis en gel de agarosa

55 Una electroforesis en gel de agarosa permite separar las moléculas de ADN según su tamaño. El principio se basa en las propiedades de la agarosa polimerizada, que actúa como tamiz molecular. Puesto que el ADN tiene carga negativa, migra a través de estos geles tras la aplicación de una corriente eléctrica de una manera dependiente del

tamaño.

Para fragmentos con un tamaño de 1 kb-14 kb se emplearon geles de agarosa al 1%, mientras que se utilizaron geles de agarosa al 1,5-2% para fragmentos más pequeños (según el fragmento de interés). Los geles se generaron añadiendo la correspondiente cantidad de agarosa a 130 ml de tampón TAE. La emulsión resultante después se calentó en un horno de microondas hasta que la agarosa sólida se disolvió. Después se añadió bromuro de etidio 50 µg/ml, y el gel se moldeó en una bandeja. Las muestras de ADN se mezclaron con 0,2 volúmenes de 5x tampón de muestras (glicerina al 30% y azul de bromofenol al 1% en 5x tampón TAE) y se aplicaron al gel. Como marcador se empleó la escalera de 1 kb o de 100 bp (NEB, Schwalbach, Alemania) según el tamaño del fragmento. Después se realizó una electroforesis a 130 V durante aproximadamente 45 minutos. Después las bandas de los fragmentos de documentaron de modo fotográfico bajo luz UV y, si se desea, las bandas se cortan para la purificación según se describe a continuación.

Tampón TAE

Tris-acetato	40 mM
EDTA	1 mM
se ajusta a pH 7,5	

Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de los fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa se realizó utilizando el ki de extracción en gel Jetsorb (Genomed, Löhne, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la adhesión intrínseca del ADN al polvo de vidrio.

Después de la separación electroforética, la banda de ADN de interés se cortó del gel y se trasladó a un tubo Eppendorf. Estas muestras se purificaron según el manual con la siguiente modificación: solo 2 µl de la suspensión de polvo de vidrio se añadió a las muestras y la elución se realizó utilizando 10 µl de H₂O. Estas modificaciones se inventaron para potenciar la concentración final de ADN, que se determinó de modo fotométrico. Unas altas concentraciones de ADN permiten potenciar las eficacias de acoplamiento y transformación que resultan especialmente importantes cuando se generan bancos de plásmidos.

Preparación de ADN genómico

Se aisló ADN genómico de células adherentes cultivadas utilizando el kit de tejidos DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la unión de ácidos nucleicos a columnas de membranas de gel de sílice. Además, el ARN se excluye de la purificación mediante digestión con ARNasa H. Así se retiene el ADN, mientras que todos los componentes celulares se eliminan en el lavado.

Las células se tripsinizaron dentro de matraces de cultivo y la suspensión celular resultante se centrifuga a 3000 rpm en una centrifuga de mesa Eppendorf. Aproximadamente 2×10^6 células se resuspendieron en 200 µl de PBS-EDTA (estas muestras pueden conservarse a -20 °C) y se aplicaron al procedimiento de purificación según se describe en el manual con la siguiente modificación: para la elución del ADN de las columnas se emplearon 80 µl de tampón AE en lugar de 200 µl para aumentar la concentración de ADN para la posterior PCR.

Secuenciación de los ácidos nucleicos

La secuenciación de los ácidos nucleicos se realizó en MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). Para este fin, muestras de ADN que contenían aproximadamente 1 µg de ADN plasmídico se secaron al vacío utilizando una centrifuga Speedvac. Las muestras secadas resultantes se enviaron a la empresa por correo ordinario, en donde fueron secuenciadas utilizando los cebadores apropiados.

Para la secuenciación de los variantes del banco, se acoplaron fragmentos de la PCR sobre vectores pGEMTeasy según las instrucciones del fabricante. Esta etapa de acoplamiento se basa en la reasociación de proyecciones A/T complementarias y la posterior formación de enlaces fosfodiéster a través de la ligasa T4. Los fragmentos de la PCR generados con la Taq polimerasa siempre muestran proyecciones-A-3', y el vector pGEMTeasy se corta de tal manera que se mantienen las proyecciones-T-5'. Por tanto, el kit proporciona una herramienta eficaz para individualizar fragmentos de ADN compuestos de diferentes variantes de secuencia mediante la transformación de *E. coli* con los vectores resultantes. Después el ADN miniprep obtenido de estos clones se emplea para la secuenciación.

Cultivo de células

Las células se cultivaron en un incubador (Heraeus, Hanau, Alemania) a 37 °C, CO₂ al 5%, y una atmósfera saturada con agua. Las células adherentes se tripsinizaron (tripsina al 0,25% en PBS) para la transferencia. Una fracción de la suspensión resultante se sembró en nuevos matraces de cultivo y se añadió medio fresco.

Líneas celulares utilizadas

HEK-293T: DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

HT1080: DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

5 HT1080-CD20: células HT1080 que expresan de forma estable CD20 humano, DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, puromicina 3 µg/ml

A-431: DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

CHO-K1: DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

CHO-hSLAM: células CHO que expresan de forma estable SLAM, RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, G418 0,5 mg/ml

10 CHO-BC1: células CHO que expresan de forma estable CD46, DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, G418 1,2 mg/ml

U-87MG: MEM con 0,85 g de NaHCO₃/l, 1 ml/100 ml de glutamina, 1 ml/100 ml de aminoácidos no esenciales, 10 ml/100 ml de FCS, 1 ml/30 ml de bicarbonato, 1 ml/100 ml de piruvato

A301: RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

15 Daudi: RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

Raji: RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

K-562: RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%

HT1080-GluR4: células HT1080 que expresan de forma estable el receptor de glutamato-4 humano, DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, G418 1,0 mg/ml

20 Congelación y descongelación de las células cultivadas

Para la conservación, las células se mantuvieron a -80 °C o, para una conservación a largo plazo, en nitrógeno líquido.

Congelación

25 Las células se tripsinizaron y se resuspendieron en un medio apropiado. Después se realizó una etapa de centrifugación (800 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrifuga Heraeus) para sedimentar las células. Estas después se resuspendieron en medio de congelación (FCS al 90%, DMSO al 10%), se dividieron en partes alícuotas de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células en criotubos y se congelaron.

Descongelación

30 Los criotubos se incubaron en un baño de agua a 37 °C hasta que el hielo se descongeló. Después, la suspensión celular se trasladó inmediatamente a un tubo Falcon con 15 ml de medio precalentado. Para excluir el DMSO citotóxico, las células después se centrifugaron (1200 rpm durante 6 min a temperatura ambiente) y se resuspendieron en medio fresco y se sembraron en matraces de cultivo apropiados.

Transfección de células

Para expresar plásmidos dentro de células eucariotas se realizó una transfección con fosfato de calcio.

35 Para la generación de partículas de vector, 24 h antes de la transfección se sembraron $6,5 \times 10^6$ células HEK-293T (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, penicilina y estreptomina al 0,5%) en un matraz T75. Una hora antes de la transfección se intercambió el medio de las células contra 5 ml de medio fresco. Se cotransfectaron 4,0 µg del plásmido que codifica un variante de proteína F y 4,0 µg de un plásmido que codifica un variante de la proteína H, 6,72 µg de plásmido encapsulante, que codifica gag/pol de VIH-1 y MLV, respectivamente, y 11,27 µg de plásmido de transferencia mediante una transfección con fosfato de calcio. El ADN plasmídico se rellena con H₂O (Sigma, W-3500) hasta 450 µl. Después se añaden 50 µl de una disolución de CaCl₂ 2,5 M (Sigma, C7902). Mientras se agita en vórtice la disolución de ADN-CaCl₂, se añaden gota a gota 500 µl de 2x tampón HBS (NaCl 281 mM (Sigma, S7653); HEPES 100 mM (Sigma, H3375); Na₂HPO₄ 1,5 mM (Sigma, S0876)). El precipitado suspendido después se trasladó a las células HEK-293T. De tres a cuatro horas después se añaden 5 ml de medio fresco y 15 h después el medio de nuevo se reemplaza por 12 ml de medio fresco.

Veinticuatro horas después, los 12 ml de sobrenadante celular que contienen las partículas de vector lentivírico pseudotipificado se filtran (filtro de 0,45 µm) y se emplean 200 µl directamente para la transducción de células

HT1080. El resto del sobrenadante se concentró mediante centrifugación a 3600 rpm (multífuga Heraeus 3S-R) y 4 °C durante al menos 16 h. El sedimento después se resuspendió en 120 µl de medio sin suero (DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l).

Transducción y titulación

- 5 Para la titulación de las disoluciones madre de partículas de vector concentradas y no concentradas, se sembraron 1,0 x 10⁵ células HT1080 (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, penicilina/estreptomycinina al 0,5%) en un único pocillo de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las disoluciones madre de vector se diluyeron en serie en etapas de 1:10 y después se añadió un total de 180 µl de las diluciones, que incluyen 1,44 µg de polibreno, a cada pocillo, se incubó durante 2,5-3 h y se sustituyó por 1 ml de medio fresco. Después de 10 48-72 h se calcularon las titulaciones determinando el número de células fluorescentes verdes por pocillo realizando el recuento en un microscopio de fluorescencia. Para el recuento se selecciona una dilución en la que significativamente menos que cada célula por pocillo ha sido transducida. Para calcular el número de partículas transductoras por ml, las células contadas por pocillo se multiplicaron por el factor de dilución y el factor 5,6 (empleando 180 µl x 5,6 = 1 ml).
- 15 Las titulaciones también se determinaron mediante un análisis FACS.

Clasificación de células activada por fluorescencia (FACS)

- El análisis FACS permite ensayar poblaciones de células para la expresión de proteínas sobre su superficie. El método utiliza la luz dispersada y la fluorescencia de anticuerpos marcados. En principio, FACS también puede utilizarse para la tinción intracelular después de una perfusión de la membrana, permitiendo así analizar la expresión de las proteínas citosólicas. Además puede detectarse la expresión citosólica de GFP.

- Las células transducidas de un pocillo con una dilución adecuada se desprenden mediante una incubación con 100 µl de disolución de PBS-tripsina. Después se añade 1 ml de tampón de lavado de FACS (PBS, FCS al 2%, NaN₃ al 0,1%) y esta disolución de células después se centrifuga durante 2 min con 3.500 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. El sedimento se resuspende en 1 ml de tampón de lavado de FACS y se centrifuga como se indicó anteriormente. Después, el sedimento celular se resuspende en 200 µl de PBS/paraformaldehído al 1%. Con la máquina FACS (sistema de citometría de flujo Dako Galaxy) se cuentan 10.000 células y, con el porcentaje indicado de células con fluorescencia verde, puede determinarse el número de partículas transductoras por ml. El número de células en el momento de la transducción se multiplica por el porcentaje indicado y después se divide entre 100. Este número de células transducidas entonces se multiplica por el factor de dilución y el factor 5,6 (empleando 180 µl x 5,6 = 1 ml).

Ejemplo 1: Proteínas H y F de MeV truncadas y mutadas

Las glicoproteínas F y H de MeV se insertaron en el vector de expresión pCG bajo el control del promotor temprano de CMV según se describe en Cathomen *et al.* (1995) y se construyeron diversos vectores pCG-H y pCG-F, en los que los genes H y F portan mutaciones puntuales, deleciones e inserciones.

- 35 Se generaron los genes de la proteína H truncada mediante una PCR utilizando pCG-H como molde. Se empleó un cebador directo complementario con la región codificadora del N-terminal del gen de la proteína H. Este cebador codifica su extremo 5' y la secuencia de nucleótidos para el sitio de restricción PstI, seguido por el triplete de metionina de inicio y la secuencia de nucleótidos de la cola citoplásmica de la proteína H, pero omite los tripletes que codifican los aminoácidos que se van a delecionar. El cebador inverso es complementario con la región codificadora del dominio transmembrana de la proteína H y comprende, en su extremo 5', la secuencia del sitio de restricción NheI. Para HcΔ8, por ejemplo, los cebadores fueron los siguientes: directo, 5'-CCTTAATTAATGGGAAGTAGGATAGTC-3'; inverso, 5'-CTAGCTAG CAACCCGATC-3'. De esta forma, el fragmento de PCR con la cola citoplásmica truncada de la proteína H puede clonarse con PstI/NheI en el plásmido pCG-H para producir, por ejemplo, pCG-HcΔ18.

- 45 El fragmento de la PCR y el ADN de pCG-H se incuban con las enzimas PstI (disponible en el mercado en NEB) y NheI (disponible en el mercado en NEB) en un tampón apropiado a 37 °C durante la noche. Los fragmentos de restricción se separan en un gel de agarosa al 1,5%. El fragmento de la PCR y el ADN del vector adecuados se extraen del gel utilizando el kit de extracción en gel Jetsorb (Genomed). El fragmento de la PCR y el ADN del vector purificados después se acoplan a 16 °C durante la noche utilizando ADN ligasa T4 (disponible en el mercado en NEB).

- Entonces se emplea la reacción de acoplamiento para transformar la cepa Top10 de *E. coli* como sigue. La reacción de acoplamiento se incubaba con 100 µl de *E. coli* Top10 químicamente competentes durante 30 min en hielo, seguido de un choque térmico a 42 °C durante 45 s. Después se añaden 500 µl de medio SOC (Invitrogen) y después las bacterias se incuban a 37 °C y 600 rpm en un termomezclador Eppendorf durante 1 h. Posteriormente, las bacterias transformadas se cultivan en una placa de LB-ampicilina y se incuban durante la noche a 37 °C. Al día siguiente se escogen algunos clones para una preparación de mini-ADN según el protocolo del kit QIAprep® Spin Miniprep Kit

(Qiagen). Después de la identificación del ADN plasmídico aislado, por ejemplo, pCG-HcΔ18, mediante una digestión con enzimas de restricción apropiadas, el ADN plasmídico puede conservarse o utilizarse directamente para otros experimentos. El mapa plasmídico para pCG-HcΔ18 se muestra en la figura 9.

5 En el caso de las proteínas HcΔ21+A y HcΔ24+4A truncadas, respectivamente, puede utilizarse el mismo cebador inverso que anteriormente, junto con los siguientes dos cebadores directos: 5'-CCTTAATTAATGGCTATAGTCATTAACAGAGAAC-3' y 5'-CCTTAATTAATGGCTGCCGAGCGAACAGAGAACATCTTATG-3', respectivamente.

10 Las proteínas F truncadas pueden generarse introduciendo un codón de fin prematuro mediante mutagénesis específica dirigida a sitio según el protocolo del kit de mutagénesis específica dirigida a sitio QuikChange® (Stratagene). Como molde, se emplea el plásmido pCG-F. Como ejemplo, pueden emplearse los cebadores 5'-GCTGCA GGGGGCGTTGAAATAAAAAGGGAGAAC-3' (para FcΔ30) y 5'-GTAATAAAAAGGGA GAATAAGTTGGTATGTCAAAG-3' (para FcΔ24) (el nucleótido intercambiado está subrayado). Como ejemplo, el mapa plasmídico para pCG-FcΔ30 se muestra en la figura 10.

15 La introducción de las cuatro mutaciones puntuales Y481A, R533A, S548L, F549S en las proteínas H truncadas también puede realizarse mediante mutagénesis específica dirigida a sitio según el protocolo del kit de mutagénesis específica dirigida a sitio QuikChange® (Stratagene). Esta mutagénesis se describe, como ejemplo, para pCG-HcΔ18, pCG-HcΔ19 y pCG-HcΔ24+4A a continuación. Como molde en la primera mutagénesis, se emplean los plásmidos pCG-HcΔ18, pCG-HcΔ19 y pCG-HcΔ24+4A, respectivamente, junto con el cebador 5'-GATTCAAGGTTAGTCCCGCACTCTTCACTGTCCC-3' (Y481A). En un segundo ciclo de mutagénesis, se emplea el
20 plásmido producido en el primer ciclo de mutagénesis como molde. El cebador utilizado es 5'-CCTACGATACTTCCGCGTTGAACA TGCTGTGG-3' (R533A). En el tercer ciclo de mutagénesis, se emplea el plásmido de la segunda mutagénesis como molde, junto con el cebador 5'-GTTTACAGCCCAAGCCGCTATCGTCTTACTT TTATCC-3' (S548L, F549S). Los nucleótidos intercambiados están subrayados. Por tanto, el plásmido de la tercera mutagénesis producido contiene las cuatro mutaciones puntuales en el ectodominio de la proteína H truncada, por ejemplo, de pCG-HmutΔ18.

En la siguiente etapa, el sitio *Sfi*I en los plásmidos pCG-HmutΔ18, pCG-HmutΔ19 y pCG-HmutΔ24+4A se destruye mediante mutagénesis específica dirigida a sitio según el protocolo del kit de mutagénesis específica dirigida a sitio QuikChange® (Stratagene). Se emplea el siguiente cebador: 5'-CTGGAATAGCTCAGAATCCGAGGCATCCTCGGCCTCTGC-3' (de nuevo, los nucleótidos intercambiados están subrayados). En una siguiente etapa, puede introducirse la región codificadora para scFvCD20 flanqueada por los sitios de restricción *Sfi*I y *Not*I, en los plásmidos pCG-HmutΔ18, pCG-HmutΔ19 y pCG-HmutΔ24+4A. El scFvCD20 se amplificó mediante PCR a partir de ADNc que codifica el anticuerpo anti-CD20 murino B9E9 (GenBank secuencia B9E9 V_H AF277091 y B9E9 V_L AF277092) con un conector 18-mero entre los dominios V_H y V_L. La región codificadora de scFvCD20 se condensa dentro de marco con el extremo C-terminal de la proteína HmutΔ. Esto se realiza mediante una PCR de fusión empleando los siguientes cebadores para la primera etapa de amplificación de la porción C-terminal de la proteína HmutΔ: 5'-CCAATGCATTGGTGAACCTAAC-3' (que codifica un sitio de restricción *Nsi*I en el extremo 5') y 5'-CCTTCCCTCGATGGCCGGCTGGGCCGCATTGGTTCCATCTTCCCG -3' (que codifica un sitio de restricción *Sfi*I y un sitio de ruptura del factor Xa en el extremo 5'). Para la primera etapa de amplificación del ADN de scFvCD20 se emplean los siguientes dos cebadores: 5'-GGCCCAGCCGCCATCGAG
40 GGAAAGATGGCTCAGTTTCAGCTG-3' (que tiene un sitio de restricción *Sfi*I y un sitio de ruptura del factor Xa en el extremo 5') y 5'-CTAGACTAGTTAGTGATGGTGGTGGTATG AGAACCTCTTGCGGCCGCTTCAGCTCCAGCTTGG-3' (que tiene un sitio de restricción *Not*I, un marcador his y un sitio de restricción *Spe*I en el extremo 5'). En la etapa de fusión, los fragmentos de PCR aislados con una secuencia solapante de 25 nucleótidos (subrayados) se mezclaron y se amplificaron con los cebadores externos, que también se emplearon para la primera ronda de amplificación. El fragmento de PCR resultante se digirió con *Nsi*I y *Spe*I (disponibles en el mercado en NEB) y se subclonaron en pCG-HmutΔ18, pCG-HmutΔ19 y pCG-HmutΔ24+4A con el sitio *Sfi*I destruido, respectivamente, según se describió para la producción de las construcciones de pCG-HΔ.
45

50 Las figuras 1A y 1B muestran la secuencia de ADN y de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje (wt) H_{Edm} de MeV, en las que la porción del dominio citoplásmico se muestra en negrita. Las figuras 2A y 2B muestran la secuencia de ADN y de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje (wt) F_{Edm} de MeV, en las que la porción del dominio citoplásmico se muestra en negrita.

60 Comenzando a partir del ADNwt, se diseñaron derivados truncados y mutados de los genes H_{Edm} y F_{Edm} de MeV. En primer lugar, se introdujeron deleciones consecutivas en el dominio citoplásmico de diferentes longitudes en la proteína H (deleciones de 14 a 24 aminoácidos) y F (deleciones de 24 y 30 aminoácidos). Las figuras 3A-3C ejemplares muestran la secuencia de ADN de tres de las proteínas H truncadas derivadas del ADN wt de H_{Edm}, concretamente, HcΔ18, HcΔ19 y HcΔ24+4A, respectivamente. La figura 3D ejemplar muestra la secuencia de aminoácidos de HcΔ18. Las figuras 3E y 3F ejemplares muestran la secuencia de ADN y de aminoácidos de una de las proteínas F truncadas derivadas del ADN wt de F_{Edm}, concretamente FcΔ30. Las porciones citoplásmicas se muestran en negrita.

Además, se añadieron de 1 a 4 restos alanina a las proteínas Hc Δ 21 y Hc Δ 24 truncadas. La figura 3G muestra la secuencia de ADN de la proteína Hc Δ 24 truncada, en la que se añadieron los cuatro restos alanina adicionales para producir así Hc Δ 24+4A. De nuevo, las porciones citoplásmicas se muestran en negrita.

5 Las figuras 4A y 4B proporcionan un visión general de algunas de las proteínas mutantes F y H generadas, en comparación con sus respectivas moléculas de tipo salvaje, indicando los restos aminoácidos delecionados (o añadidos) en la porción citoplásmica de las proteínas.

Además, se construyeron construcciones de fusión de las proteínas H mutadas y truncadas, dos de las cuales se muestran como ejemplo en las figuras 5 y 6. Comenzando a partir de Hc Δ 8, en la que la porción citoplásmica está acortada en 18 restos aminoácidos, se introdujeron cuatro mutaciones puntuales (Y481A, R533A, S548L, F549S).
 10 En una etapa posterior, se condensó un anticuerpo monocatenario (scFv) dirigido contra CD20 (scFvCD20) en el extremo C-terminal de la proteína. Las figuras 5A y 5B muestran las secuencias de ADN (SEQ ID NO:1) y de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de la molécula de HmutscFvCD20 Δ 18 resultante. Los cuatro sitios de las mutaciones están subrayados, los sitios de restricción Sfil y NotI, que flanquean a scFvCD20, se indican en cursiva, y el marcador HIS se indica subrayado y en cursiva. La figura 5C muestra el mapa plasmídico del plásmido HmutscFvCD20 Δ 18. Así, el scFvCD20 puede eliminarse con facilidad por escisión utilizando las enzimas de restricción Sfil y NotI, y después ser reemplazado por cualquier otro anticuerpo monocatenario, ligando o citoquina.
 15 Un ejemplo de un ligando es el ligando EGF, cuya secuencia de ADN y de aminoácidos se muestra en las figuras 6A y 6B (los sitios de restricción se indican en cursiva), que se empleó para construir una correspondiente molécula de HmutEGF Δ 18 (SEQ ID NO:3 y 4).

20 Ejemplo 2: Producción, aislamiento de partículas de vector de virus lentivírico pseudotipificado y titulación utilizando células HT1080

Se produjeron partículas de vector lentivírico pseudotipificado mediante la cotransfección de células HEK-293T con un plásmido encapsulante, un vector de transferencia y los dos plásmidos que codifican los variantes de las proteínas H y F, respectivamente. El plásmido encapsulante pCMV Δ R.8.9 que codifica los genes *gag* y *pol* de VIH-1
 25 se muestra en la figura 11 y, como ejemplo, el plásmido de transferencia SEW (que codifica eGFP) se muestra en la figura 12. Sin embargo, tal como se indica, pueden utilizarse otros plásmidos de transferencia, tales como pHRMVGFP que codifica un gen indicador GFP.

De modo específico, 24 h antes de la transfección, se sembraron $6,5 \times 10^6$ células HEK-293T (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, penicilina y estreptomina al 0,5%) en un matraz T75. Una hora antes de la transfección se intercambié el medio de las células contra 5 ml de medio fresco. Se cotransfectaron 4,0 μ g del plásmido pCG-Fc Δ 30, que codifica la proteína Fc Δ 30 de MeV, y 4,0 μ g del plásmido pCG-Hc Δ 18, que codifica la proteína Hc Δ 18 de MeV, 6,72 μ g del plásmido pCMV Δ R8.9, que codifica *gag/pol* de VIH-1, y 11,27 μ g del plásmido pHRMVGFP mediante una transfección con fosfato de calcio. El ADN plasmídico se rellena con H₂O (Sigma, W-3500) hasta 450 μ l. Después se añaden 50 μ l de una disolución de CaCl₂ 2,5 M (Sigma, C7902).
 30 Mientras se agita en vórtice la disolución de ADN-CaCl₂, se añaden gota a gota 500 μ l de 2x tampón HBS (NaCl 281 mM (Sigma, S7653); HEPES 100 mM (Sigma, H3375); Na₂HPO₄ 1,5 mM (Sigma, S0876)). El precipitado suspendido después se trasladó a las células HEK-293T. De tres a cuatro horas después se añaden 5 ml de medio fresco y 15 h después el medio de nuevo se reemplaza por 12 ml de medio fresco.

Veinticuatro horas después, los 12 ml de sobrenadante celular que contienen las partículas de vector lentivírico pseudotipificado se filtran (filtro de 0,45 μ m) y se emplean 200 μ l directamente para la transducción de células HT1080. El resto del sobrenadante se concentró mediante centrifugación a 3600 rpm (multifuga Heraeus 3S-R) y 4 °C durante al menos 16 h. El sedimento después se resuspendió en 120 μ l de medio sin suero (DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l).
 40

Para la titulación de las disoluciones madre de partículas de vector concentradas y no concentradas, se sembraron $1,0 \times 10^5$ células HT1080 (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina/estreptomina al 0,5%) en un único pocillo de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las disoluciones madre de vector se diluyeron en serie en etapas de 1:10 y después se añadió un total de 180 μ l de las diluciones, que incluyen 1,44 μ g de polibreno, a cada pocillo, se incubó durante 2,5-3 h y se substituyó por 1 ml de medio fresco. Después de 48-72 h se calcularon las titulaciones determinando el número de células fluorescentes verdes por pocillo realizando el recuento en un microscopio de fluorescencia. Para el recuento se selecciona una dilución en la que significativamente menos que cada célula ha sido transducida. Para calcular el número de partículas de vector transductoras por ml, las células contadas por pocillo se multiplicaron por el factor de dilución y el factor 5,6 (empleando $180 \mu\text{l} \times 5,6 = 1 \text{ ml}$).
 45
 50

Las titulaciones también se determinaron mediante un análisis FACS. Para este fin, las células de un pocillo con una dilución adecuada se desprenden mediante una incubación con 100 μ l de disolución de PBS-tripsina. Después se añade 1 ml de tampón de lavado de FACS (PBS, FCS al 2%, Na₃N al 0,1%) y esta disolución de células después se centrifuga durante 2 min con 3.500 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. El sedimento se resuspende en 1 ml de tampón de lavado de FACS y se centrifuga como se indicó anteriormente. Después, el sedimento celular
 55

se resuspende en 200 μ l de PBS/paraformaldehído al 1%. Con la máquina FACS (sistema de citometría de flujo Dako Galaxy) se cuentan 10.000 células y, con el porcentaje indicado de células con fluorescencia verde, puede determinarse el número de partículas de vector transductoras por ml. El número de células en el momento de la transducción se multiplica por el porcentaje indicado y después se divide entre 100. Este número de células transducidas entonces se multiplica por el factor de dilución y el factor 5,6 (empleando 180 μ l x 5,6 = 1 ml).

Las figuras 7A-7D muestran ejemplos de fotografías microscópicas de células HT1080 transducidas con las partículas de vector pseudotipificado. En todos los casos, las células HEK-293T se cotransfectaron con el plásmido encapsulante pCMV Δ R8.9 y el plásmido del gen indicador GFP pHRCMVGFP según se describió anteriormente. La figura 7A muestra el resultado de otra cotransfección con pCG-Fc Δ 30 y pCG-Hc Δ 18. La figura 7B muestra el resultado de otra cotransfección con pCG-Fc Δ 30 y pCG-Hc Δ 19. La figura 7C muestra el resultado de otra cotransfección con pCG-Fc Δ 30 y pCG-Hc Δ 24+4A. La figura 7D muestra el resultado de otra cotransfección con pCG-Fwt y pCG-Hwt. Así, las figuras 7A-7D muestran los resultados de la transducción de GFP de células HT1080 por medio de las partículas de vector lentivírico de la invención pseudotipificado con Fc Δ 30/Hc Δ 18, Fc Δ 30/Hc Δ 19, Fc Δ 30/Hc Δ 24+4A, y Fwt/Hwt, respectivamente.

Los resultados claramente demuestran que las partículas de vector pseudotipificado con las versiones truncadas de las proteínas F y H de MeV son capaces de transducir de forma eficaz el gen GFP en las células HT1080 (figuras 7A-7C), mientras que las partículas de vector pseudotipificado con las respectivas proteínas de tipo salvaje no son capaces (figura 7D).

Además, se determinaron las titulaciones de las partículas de vector pseudotipificado de la invención producidas. La tabla 1 resume los resultados de la transducción de las células HT1080 por una selección ejemplar de estas partículas de vector lentivírico pseudotipificado.

Tabla 1: Titulaciones de partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con F/H de MV

Variantes de F/H	t.u./ml HT1080 ¹	t.u./ml HT1080 ²	t.u./ml CHO-K1 ^{2/3}
F _{wt} H _{wt}	22,4 ⁺	0 ⁺	0
F _{wt} Hc Δ 14	16,8 ⁺	40,0 ⁺	0
Fc Δ 24 H _{wt}	16,8 ⁺	10,0 ⁺	0
Fc Δ 24 H Δ 14	1,2 x 10 ³⁺	2,1 x 10 ⁴⁺	0
Fc Δ 24 H Δ 15	7,3 x 10 ²	6,3 x 10 ³	0
Fc Δ 24 H Δ 17	7,5 x 10 ³	1,4 x 10 ⁵	0
Fc Δ 24 H Δ 18	4,9 x 10 ³⁺	5,2 x 10 ⁴	0
Fc Δ 24 H Δ 19	1,9 x 10 ⁴⁺	6,0 x 10 ⁵	0
Fc Δ 24 H Δ 20	4,7 x 10 ³	3,1 x 10 ⁴	0
Fc Δ 24 H Δ 21+A	1,8 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁵	0
Fc Δ 24 H Δ 24+4A	1,0 x 10 ³	6,4 x 10 ⁴	0
Fc Δ 30 H Δ 14	2,5 x 10 ³	1,0 x 10 ⁴	0
Fc Δ 30 H Δ 15	3,4 x 10 ³	2,2 x 10 ⁴	0
Fc Δ 30 H Δ 17	1,6 x 10 ³	2,0 x 10 ⁴	0
Fc Δ 30 H Δ 18	2,4 x 10 ⁵⁺	6,2 x 10 ⁶⁺	0
Fc Δ 30 H Δ 19	1,5 x 10 ⁵⁺	2,9 x 10 ⁶⁺	0
Fc Δ 30 H Δ 20	1,2 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁵	0
Fc Δ 30 H Δ 24+4A	2,1 x 10 ⁵	5,3 x 10 ⁶	0
Control pos.: VSV-G	-	-	1,1 x 10 ⁸
Control neg.: MLV Env _{eco}	30,8 ⁺⁺	40,9 ⁺⁺	90

¹ Se emplearon sobrenadantes de células no concentrados.

² Se emplearon sobrenadantes de células concentrados.

³ Las células CHO-K1 no expresan CD46 y SLAM.

+ media de 2 experimentos

++ media de 4 experimentos

- no se realizó el experimento

Así, los resultados de los experimentos demuestran que el uso de una combinación de proteínas F y H de MeV truncadas genera partículas de vector lentivírico pseudotipificado que infectan y transducen, de forma eficaz y selectiva, sus células diana, es decir, células que expresan el marcador de la superficie CD46 o SLAM. De forma significativa, las partículas de vector lentivírico de la invención no se dirigen a células CHO-K1 que no expresan CD46 o SLAM.

Exclusión de la pseudotransducción mediante una inhibición con transcriptasa inversa

Para verificar que las titulaciones observadas de las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado de MeV descritas anteriormente no son debidas a una pseudotransfección, que significa la transferencia de proteínas desde las células productoras a las células diana, sino que son debidas a la transferencia de genes víricos, células HT1080 fueron transducidas por las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado de MeV descritas anteriormente en presencia o en ausencia del inhibidor de la transcriptasa inversa azidotimidina (AZT). En presencia de AZT se evita la transcripción inversa del vector de transferencia y así se bloquea la expresión de GFP en las células transducidas. En contraste, la transferencia de la proteína GFP no se verá inhibida.

Se sembraron $1,0 \times 10^5$ células HT1080 por pocillo de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, una hora después de la transducción, la mitad de las células se incubaron con un medio que contenía $10 \mu\text{M}$ del inhibidor de la transcriptasa inversa azidotimidina (AZT). Mientras, las partículas de vector de VIH-1 concentradas pseudotipificadas con las proteínas H y F de MeV modificadas se diluyeron en serie en etapas de 1:10 en un medio que contenía AZT $10 \mu\text{M}$ y en medio sin AZT, respectivamente. Entonces se añadió un total de $180 \mu\text{l}$ de las diluciones, que incluyen $1,44 \mu\text{g}$ de polibreno, por pocillo, a las células preincubadas con AZT y no incubadas, respectivamente. Después de 2,5-3 h, la mezcla de transducción se sustituyó por 1 ml de medio fresco con o sin AZT. Después de 48-72 h, las titulaciones se calcularon como se describió anteriormente. La reducción de la titulación en presencia de AZT se muestra en la figura 13. Puesto que las titulaciones de las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con las glicoproteínas de MeV modificadas disminuyen en 90% al 97% en presencia de AZT (véase la figura 13), puede excluirse la pseudotransducción.

Ejemplo 3: Titulación de partículas de vector lentivírico utilizando células HEK-293T, U-87MG, A301 y A-431

Para determinar si otras células que no sean HT1080 pueden ser transducidas de modo eficaz y específico por las partículas de vector lentivírico pseudotipificado de la presente invención, se realizó un conjunto de experimentos de titulación diferentes utilizando otras cuatro líneas de células. Se ensayaron cuatro representantes de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado del ejemplo 2 y se realizó la titulación como se describió anteriormente. Para la transducción de células HEK-293T (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO_3 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, penicilina/estreptomicina al 0,5%) y células U-87MG (en MEM con 0,85 g de NaHCO_3 /l, 1 ml/100 ml de glutamina, 1 ml/100 ml de aminoácidos no esenciales, 10 ml/100 ml de FCS, 1 ml/30 ml de bicarbonato, 1 ml/100 ml de piruvato) se emplearon $1,5 \times 10^5$ y $7,2 \times 10^4$ células por pocillo de una placa de 24 pocillos. Para la transducción de las células A301 (en RPMI 1640 con NaHCO_3 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%), células A-431 (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO_3 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, penicilina/estreptomicina al 0,5%) y células CHO-K1 (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO_3 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, penicilina/estreptomicina al 0,5%) se emplearon $1,0 \times 10^5$, $1,25 \times 10^5$ y $7,5 \times 10^4$ células por pocillo de una placa de 24 pocillos. Por lo demás, se emplearon las mismas condiciones que para las células HT1080.

Las titulaciones de la suspensión de la línea celular A301 se determinaron de forma precisa mediante un análisis FACS. Para este fin, las células de un pocillo con una dilución adecuada se centrifugaron como se describe en el experimento 2. El sedimento se resuspendió en tampón de lavado FACS y se centrifugó como se indicó anteriormente. Esta etapa se repitió una vez más y después el sedimento se resuspendió en $200 \mu\text{l}$ de PBS/paraformaldehído al 1%. Por lo demás, se empleó el mismo procedimiento descrito en el experimento 2.

La tabla 2 resume los resultados de la transducción de células HEK-293T, U-87MG, A301 y A-431 utilizando las partículas de vector lentivírico pseudotipificado.

Tabla 2: Titulaciones de las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con F/H de MV

Variantes de F/H	t.u./ml 293T ²	t.u./ml U-87MG ²	t.u./ml A301 ²	t.u./ml A-431 ²	t.u./ml CHO-K1 ^{2/3}
F _{wt} H _{wt}	0	0	-	-	0
F _{Δ24} H _{Δ14}	$2,9 \times 10^3$	$3,42 \times 10^3$	-	-	0
F _{Δ30} H _{Δ18}	$1,0 \times 10^6$	$\geq 1 \times 10^{6\#}$	$6,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^{5+}$	0
F _{Δ30} H _{Δ19}	$2,0 \times 10^5$	$\geq 1 \times 10^{6\#}$	$1,98 \times 10^5$	-	0
F _{Δ30} H _{Δ24+4A}	$1,6 \times 10^6$	$\geq 1 \times 10^{6\#}$	-	-	0
Control pos.: VSV-G	-	-	-	-	$1,1 \times 10^8$

Variantes de F/H	t.u./ml 293T ²	t.u./ml U-87MG ²	t.u./ml A301 ²	t.u./ml A-431 ²	t.u./ml CHO-K1 ^{2/3}
Control neg.: MLV Env _{eco}	60,0 ⁺	0 ⁺	0	8,4 x 10 ²⁺	90
² Se emplearon sobrenadantes de células concentrados. ³ Las células CHO-K1 no expresan CD46 y SLAM. ⁺ media de 2 experimentos [#] las titulaciones no pudieron calcularse con exactitud - no se realizó el experimento					

5 Todas las líneas celulares, excepto A301, solo expresan CD46, y las células A301 expresan CD46 y SLAM. Por tanto, también diversos otros tipos de células, que al menos portan uno de los dos marcadores celulares CD46 y SLAM, respectivamente, pueden ser transducidas específicamente utilizando las partículas de vector lentivírico pseudotipificado de la presente invención. De nuevo, las células CHO-K1, que no portan CD46 ni SLAM sobre su superficie, no son transducidas por las partículas de vector lentivírico pseudotipificado descrito en la presente.

Ejemplo 4: Efecto de la proporción de F:H sobre la eficacia de la transducción

Se realizó una serie de experimentos para determinar si la proporción de la proteína F a la proteína H, incorporadas en las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, produce algún efecto sobre la eficacia de la transducción de dichas partículas de vector.

10 Se generan partículas de vector lentivírico pseudotipificado básicamente como se describió en el ejemplo 2. Sin embargo, la cantidad de los plásmidos pCG-HcΔ19 y pCG-FcΔ30 sí varió. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con 6,72 μg de plásmido encapsulante que codifica gag/pol de VIH-1, 11,27 μg de plásmido de transferencia que codifica GFP, y diferentes cantidades de los dos plásmidos que codifican la proteína HcΔ19 y FcΔ30, respectivamente, por ejemplo, 1 μg de pCG-HcΔ19 y 7 μg de pCG-FcΔ30. Esto se realizó mediante una
 15 transfección con fosfato de calcio, según se describe en el ejemplo 2. Aproximadamente 48 h después de la transfección, los sobrenadantes celulares, que contienen los vectores de VIH-1 pseudotipificados con las proteínas HcΔ19/FcΔ30 se filtraron y se emplearon para la transducción de células HT1080 según se describió en el ejemplo 2.

20 La tabla 3 resume los resultados de los experimentos de transducción de células HT1080 empleando las partículas de vector lentivírico pseudotipificado descritas en la presente que tienen diferentes proporciones de proteínas F:H. La titulación de las partículas de vector que resultan de la transfección con la misma cantidad de plásmidos pCG-HcΔ19 y pCG-FcΔ30 se ajustó como 100%. Después otras titulaciones se normalizaron a este valor.

Tabla 3: Titulaciones relativas de partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HcΔ19/FcΔ30 utilizando diferentes cantidades de plásmidos pCG-HcΔ19 y pCG-FcΔ30 para la producción de partículas de vector

Cantidad de pCG-HcΔ19 [μg]	Cantidad de pCG-FcΔ30 [μg]	Titulación relativa (%)
4	4	100
5,5	2,5	0,16
6	2	0,08
7	1	0,39
7,8	0,2	0,47
3	5	106
2,5	5,5	494
2	6	514
1	7	2157
0,6	7,4	471
0,2	7,8	5,41

25 Estos resultados demuestran claramente que la titulación de las partículas de vector se corresponde directamente con la proporción F:H del plásmido utilizado para la producción de las partículas de vector y, así, se corresponde directamente con la proporción de proteínas F:H que realmente se incorporan en las partículas de vector lentivírico pseudotipificado. Resulta evidente que la titulación puede ser aumentada drásticamente por una concentración

mayor de proteína F, según se incorpora en las partículas de vector resultantes. Una proporción de 7:1 (proteína F:H) produce, de modo inesperado, resultados especialmente buenos.

Ejemplo 5: Partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula, dirigidas a células que expresan CD20

5 En la siguiente serie de experimentos, se investigó la capacidad de las partículas de vector pseudotipificado para dirigirse a células que muestran marcadores de la superficie celular (por ejemplo, marcadores de la superficie celular tales como cúmulos de diferenciación, o receptores) distintos de CD46 y SLAM. Las partículas de vector utilizadas para estos estudios fueron pseudotipificadas con una proteína F truncada y también comprenden una proteína H de fusión truncada, mutada y quimérica que muestra, como ejemplo, un anticuerpo monocatenario contra CD20 o el ligando EGF (ejemplo 6) en su ectodominio. La mutación de la proteína H de MeV comprende las cuatro mutaciones puntuales Y481A, R533A, S548L y F549S, que dificultan las interacciones productivas con CD46 y SLAM, respectivamente.

Así, no se espera que estas partículas de vector lentivírico pseudotipificado entren con éxito en las células a través de CD46 o SLAM, sino que se dirijan y entren solo en las células que muestran los respectivos marcadores correspondientes en su superficie.

15 Se generaron partículas de vector lentivírico pseudotipificado según se describe en el ejemplo 2. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con el plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, el plásmido de transferencia que codifica GFP y los dos plásmidos que codifican HmutscFvCD20Δ18, HmutscFvCD20Δ19 y HmutscFvCD20Δ24+4A, respectivamente, y FcΔ30. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares que contienen las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado se filtraron, se concentraron y después se emplearon para la transducción de células HT1080-CD20 y HT1080. Las células HT1080-CD20 expresan de forma estable CD20 humano. Como controles positivo y negativo, se empleó el sobrenadante celular concentrado procedente de células HEK-293T cotransfectadas con el plásmido encapsulante, el plásmido de transferencia, y el plásmido que codifica VSV-G y MLV Env_{eco}, respectivamente.

25 Las figuras 8A-8F presentan los resultados de estos experimentos. Mientras que las células HT1080 que expresan CD46 y SLAM no son transducidas por las partículas de vector pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ19 y FcΔ30 (figura 8B), resulta claramente evidente una transducción clara y eficaz de las células HT1080-CD20, que también expresan CD20 (figura 8A). Las figuras 8C-F muestran los controles positivo y negativo del experimento (figura 8C: control positivo empleando células HT1080-CD20; figura 8D: control positivo empleando células HT1080; figura 8E: control negativo utilizando células HT1080-CD20; figura 8F: control negativo empleando células HT1080).

30 Además, se determinaron las titulaciones de tres diferentes partículas de vector pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ19/FcΔ30 para las células HT1080-CD20 en comparación con las células HT1080. Se generaron partículas de vector pseudotipificado con FcΔ30 y HmutscFvCD20Δ18, HmutscFvCD20Δ19 y HmutscFvCD20Δ24A+4A, respectivamente, y se ensayaron en células HT1080-CD20 y HT1080 según se describió anteriormente. La tabla 4 resume el resultado de estos experimentos.

35 Tabla 4: Titulaciones de partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30, HmutscFvCD20Δ19/FcΔ30 y HmutscFvCD20Δ24+4A/FcΔ30, respectivamente, en células HT1080-CD20 y HT1080

Proteínas de la envuelta	HT1080-CD20 ⁺ [t.u./ml] ⁺⁺	HT1080 [t.u./ml] ⁺⁺
HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30	2,0 x 10 ⁵	9,8 x 10 ²
HmutscFvCD20Δ19/FcΔ30	1,32 x 10 ⁶	3,9 x 10 ³
HmutscFvCD20Δ24A+4A/FcΔ30	8,6 x 10 ³	2,0 x 10 ²
Control pos.: VSV-G	6,9 x 10 ⁹	1,8 x 10 ¹⁰
Control neg.: MLV Env _{eco}	4,8 x 10 ²	1,46 x 10 ³
⁺ Células HT1080 que expresan de forma estable CD20 humano. ⁺⁺ Titulaciones de un experimento; se emplearon sobrenadantes celulares concentrados.		

40 Así, estos resultados establecen que las partículas de vector lentivírico pseudotipificado con una proteína F de MeV truncada y una construcción de fusión de una proteína H de MeV truncada y mutada que presenta un anticuerpo monocatenario en su ectodominio solo entran en las células que expresan el respectivo marcador celular para el anticuerpo monocatenario. En el presente experimento, las partículas de vector pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18, HmutscFvCD20Δ19 o HmutscFvCD20Δ24A+4A, respectivamente, y FcΔ30, pueden transducir con eficacia las células que expresan CD20, pero las titulaciones y la transducción son significativamente menores en células que no expresan CD20. Además, la transducción se produce independientemente de la expresión de CD46 o SLAM por la célula diana.

Transducción selectiva de linfocitos que expresan CD20 en la naturaleza por partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30

Además, linfocitos que expresan CD20 en la naturaleza pueden ser transducidos de forma selectiva y eficaz por las partículas de vector dirigidas anti-CD20. Se emplearon las partículas de VIH-1 descritas anteriormente, pseudotipificadas con HmutscFvCD20 Δ 18 y Fc Δ 30 para la transducción de células Daudi CD20-positivas (línea de células B; ECACC 85011437) y células K-562 CD20-negativas (línea de células mieloides; ATCC CCL-243). Como control positivo se emplearon partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con VSV-G para la transducción de estas dos líneas celulares.

Para la transducción de las dos líneas celulares se empleó una MOI de 0,5 (partículas de vector pseudotipificado con VSV-G: MOI 2). Para el prerrevestimiento, la mitad de las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30 o VSV-G concentradas se diluyeron en 120 μ l de medio (RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%) y se trasladaron a un único pocillo de una placa de 48 pocillos revestida con fibronectina. Esta placa después se centrifugó a 860 g durante 20 min a 4 °C. Mientras, la otra mitad de las partículas de vector se diluyó en 180 μ l de medio (suplementado con 1,2 μ g de sulfato de protamina) que contiene 1 x 10⁵ células Daudi (CD20+) o K-562 (CD20-) y se añade a los pocillos con las respectivas partículas de vector prerrevestido. Después se realizó una etapa de centrifugación a 860 g durante 1 h a 32 °C. Después de 2 h más de incubación a 37°C en el incubador se añadieron 700 μ l de medio por pocillo. Se detectó la fluorescencia de GFP de las células transducidas mediante FACS (BD FACSCalibur, véase la figura 14) 72 h después de la transducción.

Mientras que las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con VSV-G transducen ambas líneas celulares con eficacia (véase la figura 14a), las partículas de vector de VIH pseudotipificado con HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30 transdujeron selectivamente las células Daudi CD20-positivas, mientras que las células K-562 CD20-negativas permanecieron en gran medida GFP-negativas (véase la figura 14b). Por consiguiente, también las células que expresan en la naturaleza el receptor diana pueden ser selectivamente transducidas por los vectores dirigidos. De forma notable, los linfocitos CD20-positivos fueron transducidos por las partículas de vector dirigido anti-CD20 con una eficacia similar que con las partículas de vector pseudotipificado con VSV-G (véase la figura 14).

Cultivo a largo plazo de las células transducidas

Para verificar la estabilidad de la transferencia de genes por los vectores dirigidos, se añadieron partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30 (MOI 0,1) junto con 4,0 μ g de sulfato de protamina a 2 x 10⁵ células Raji CD20-positivas (línea de células B; ATCC CCL-86; RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%) a un único pocillo de una placa de 24 pocillos que produce 1 ml de mezcla de transducción. Después, esta placa se centrifugó a 860 g durante 1 h a 32 °C. Las células transducidas después se cultivaron durante 19 días a 37 °C. En diferentes momentos se determinó el porcentaje de células GFP-positivas mediante un análisis FACS (sistema de citometría de flujo Dako Galaxy, véase la figura 15). Los datos demuestran que el nivel de células GFP-positivas permanece entre 17% y 23% a lo largo del periodo completo de 19 días (véase la figura 15), lo cual confirma la estabilidad de la transferencia de genes mediada por las partículas de vector dirigido anti-CD20.

Ejemplo 5.2: Efecto de la proporción de HmutscFvCD20 Δ 18:Fc Δ 30 sobre la eficacia de la transducción

Se realizó una serie de experimentos para determinar si la proporción de la proteína Fc Δ 30 a proteína HmutscFvCD20 Δ 18, incorporadas a las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, tiene el mismo efecto sobre la eficacia de la transducción de dichas partículas de vector como el demostrado en el ejemplo 4 para la proporción de Fc Δ 30 a Hc Δ 19.

Las partículas de vector lentivírico pseudotipificado se generaron básicamente como se describió en el ejemplo 5. Sin embargo, la cantidad de los plásmidos pCG-HmutscFvCD20 Δ 18 y pCG-Fc Δ 30 sí varió. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con 6,72 μ g de plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, 11,27 μ g de plásmido de transferencia que codifica GFP, y diferentes cantidades de los dos plásmidos que codifican la proteína HmutscFvCD20 Δ 18 y Fc Δ 30, respectivamente, por ejemplo, 2 μ g de pCG-HmutscFvCD20 Δ 18 y 6 μ g de pCG-Fc Δ 30. Esto se realizó mediante una transfección con fosfato de calcio, según se describe en el ejemplo 2. Aproximadamente 48 h después de la transfección, los sobrenadantes celulares, que contienen las diferentes partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con las proteínas HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30 se filtraron y se emplearon para la transducción de células HT1080-CD20 según se describió en el ejemplo 5.

La figura 16 resume los resultados de los experimentos de transducción de células HT1080-CD20 empleando las partículas de vector lentivírico pseudotipificado descritas en la presente producidas con las proporciones indicadas de pCG-HmutscFvCD20 Δ 18 y pCG-Fc Δ 30. La titulación de las partículas de vector que resultan de la transfección con la misma cantidad de plásmidos pCG-HmutscFvCD20 Δ 18 y pCG-Fc Δ 30 se ajustó como 100%. Después, otras titulaciones se normalizaron a este valor.

Estos resultados claramente demuestran que la titulación de las partículas de vector se corresponde directamente con la proporción del plásmido HmutscFvCD20 Δ 18:Fc Δ 30 usada para la producción de las partículas de vector, y así

se corresponde directamente con la proporción de proteínas HmutscFvCD20 Δ 18:Fc Δ 30 que realmente se incorpora en las partículas de vector lentivírico pseudotipificado. Resulta evidente que la titulación puede ser aumentada por una incorporación mayor de proteína Fc Δ 30 en las partículas de vector resultantes. Una proporción de 1:3 de proteínas HmutscFvCD20 Δ 18:Fc Δ 30 produce resultados especialmente buenos (véase la figura 16). Pero en comparación con los resultados de la titulación de Hc Δ 19:Fc Δ 30 descritos en el ejemplo 4, es necesaria relativamente más proteína H cuando un anticuerpo monocatenario está unido a su ectodominio. Así, las titulaciones de los vectores dirigidos pueden optimizarse titulando la proporción para cualquier variante de proteína H que incluya un nuevo tipo de anticuerpo monocatenario u otro polipéptido.

Ejemplo 5.3: Transferencia de genes dirigida a células SLAM-positivas utilizando partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con las glicoproteínas modificadas de una cepa de tipo salvaje del virus del sarampión

Para el transporte dirigido a células que expresan SLAM se utilizaron partículas de vector de VIH-1 que había sido pseudotipificado con las glicoproteínas modificadas del virus del sarampión de tipo salvaje 323, un clon molecular de la capa IC-B. Esta cepa del virus del sarampión solo puede entrar a través de SLAM, pero no a través de CD46 (Takeda *et al.*, 2000, *J. Virol.*, 74 (14), pp. 6643-6647). Después del truncamiento de las colas citoplásmicas de las proteínas F y H de tipo salvaje (una secuencia de la cola citoplásmica idéntica a la de las proteínas F/H de la cepa Edmonston), según se describe en el ejemplo 1, fue posible la pseudotipificación de las partículas de VIH-1.

Las partículas de vector lentivírico pseudotipificado se generaron básicamente como se describió en el ejemplo 2. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con 6,72 μ g de plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, 11,27 μ g de plásmido de transferencia que codifica GFP, 1,0 μ g del plásmido que codifica Hwt Δ 18 y 7,0 μ g de plásmido que codifica Fwt Δ 30. Esto se realizó mediante una transfección con fosfato de calcio, según se describe en el ejemplo 2. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares, que contienen las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado, se filtraron, se concentraron (según se describe en el ejemplo 2) y después se emplearon para la transducción de una mezcla de células Raji SLAM-positivas y HT1080 SLAM-negativas.

Para la transducción se sembraron $1,0 \times 10^5$ células HT1080 y la misma cantidad de células Raji en un único pocillo de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las disoluciones madre de las partículas de vector se diluyeron 1:10, 1:50 y 1:500, y un total de 300 μ l de las diluciones, que incluyen 1,2 μ g de sulfato de protamina, se añadieron a la mezcla de células. Después se realizó una etapa de centrifugación a 860 g durante 1 h a 32 °C. Después se añadieron 700 μ l de medio (RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%) por pocillo. Cuarenta y ocho horas después de la transducción, las células Raji se retiraron de la capa de células HT1080 y se trasladaron a un tubo de reacción. Las células HT1080 se desprendieron de la placa mediante una incubación con 100 μ l de disolución de PBS-tripsina y se trasladaron a otro tubo de reacción. Después se determinó el patrón de la reacción midiendo las células positivas a GFP y CD20 mediante FACS. Para este fin, las células se centrifugaron durante 2 min a 3.500 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. Los sedimentos después se resuspendieron en 1 ml de tampón de lavado FACS (PBS, FCS al 1%, NaN₃ al 0,1%) y se centrifugaron igual que antes. Después, los sedimentos se incubaron durante 1 h a 4 °C en una dilución apropiada de anticuerpo anti-CD20 (clon B9E9 anti-CD20 humano, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania). Después las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS y se incubaron durante 1 h a 4 °C en la oscuridad en una dilución apropiada de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón directamente acoplado con el fluoróforo R-ficoeritrina (PE) (fragmento F(ab')₂ anti-IgG de ratón-PE, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania). Después, las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS/paraformaldehído al 1%. Después, las células CD20-positivas y GFP-positivas se midieron mediante FACS (véase la figura 17).

Los datos de FACS demuestran que las células Raji y HT1080 habían sido separadas con éxito, puesto que en la fracción de células Raji, casi todas las células eran CD20-positivas (véase la figura 17a), mientras que en la fracción de células HT1080, casi todas las células eran CD20-negativas (véase la figura 17b). Tal como se demuestra en la figura 17a, casi todas las células Raji fueron transducidas por las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con Hwt Δ 18/Fwt Δ 30 también a la dilución 1:50. Por contraste, casi no se detectaron células HT1080 GFP-positivas. Sólo pudieron detectarse algunas células CD20+ contaminantes (véase la figura 17b). Estos datos demuestran que los linfocitos humanos pueden ser transducidos con eficacia con partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con proteínas H y F de una cepa del virus del sarampión de tipo salvaje.

Ejemplo 6: Partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula, dirigidas a células que expresan EGFR

En la siguiente serie de experimentos se investigó la capacidad de las partículas de vector para dirigirse a células que muestran ciertos marcadores, distintos de CD46 y SLAM, utilizando un segundo conjunto de partículas de vector pseudotipificado. Las partículas de vector utilizadas para estos estudios se produjeron de una manera similar a las partículas de vector descritas en el ejemplo 5; sin embargo, comprendían una proteína H de fusión mutada y quimérica que muestra ejemplarmente el ligando EGF en su ectodominio. De forma específica, se generaron partículas de vector pseudotipificado con Fc Δ 30 y HmutEGF Δ 18, HmutEGF Δ 19 y HmutEGF Δ 24+4A, respectivamente, y se ensayaron en las líneas celulares A-431, CHO-hSLAM y CHO-BC1. Las células A431 actúan como control positivo para EGFR, puesto que expresan niveles altos de EGFR. Las células CHO-hSLAM y CHO-

BC1 expresan de forma estable SLAM y CD46 humanos, respectivamente. La tabla 5 resume el resultado de estos experimentos.

Tabla 5: Titulaciones de las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutEGF Δ 18/Fc Δ 30, HmutEGF Δ 19/Fc Δ 30 y HmutEGF Δ 24+4A/Fc Δ 30, respectivamente, en células A-431, CHO-hSLAM y CHO-BC1

Proteínas de la envuelta	A-431 [t.u./ml] ⁺⁺	CHO-hSLAM [t.u./ml] ⁺⁺	CHO-BC1 ² [t.u./ml] ⁺⁺
HmutEGF Δ 18/Fc Δ 30	2,7 x 10 ⁵⁺	2,8 x 10 ²⁺	0
HmutEGF Δ 19/Fc Δ 30	2,2 x 10 ⁴	1,6 x 10 ²	0
HmutEGF Δ 24+4A/Fc Δ 30	5,8 x 10 ⁴	9,6 x 10 ²	8 x 10 ²
Control positivo: VSV-G	3,9 x 10 ⁹⁺	5,7 x 10 ⁹⁺	9,3 x 10 ⁹
Control negativo: MLV Env _{eco}	8,4 x 10 ²⁺	1,2 x 10 ³⁺	2,2 x 10 ³

¹ Células CHO que expresan de modo estable SLAM humano.
² Células CHO que expresan de modo estable CD40 humano.
⁺ Media de dos experimentos.
⁺⁺ Se emplearon sobrenadantes celulares concentrados.

5 Según los resultados del ejemplo 5, el segundo conjunto de partículas de vector lentivírico pseudotipificado dirigidas a la entrada en la célula también transdujeron, de modo notable y específico, a las células diana. Así, las partículas de vector pseudotipificado con HmutEGF Δ 18, HmutEGF Δ 19 o HmutEGF Δ 24+4A, respectivamente, y Fc Δ 30, pueden transducir con eficacia células que expresan el receptor EGF como marcador celular. De forma notable, las titulaciones y la transducción son significativamente menores para las células que no expresan este receptor.

10 En resumen, las partículas de vector lentivírico de la invención, cuando se pseudotipifican con una proteína F de MeV truncada y una construcción de fusión de una proteína H de MeV truncada y mutada que incluye un anticuerpo monocatenario, o un ligando con un marcador celular en su ectodominio, entran específicamente en células que expresan el respectivo marcador celular para el anticuerpo monocatenario o el ligando. Las partículas de vector de la presente invención, así, entran y transducen con eficacia células que expresan los correspondientes marcadores de proteínas, y las titulaciones y también la transducción son mucho menores en células que no expresan estos marcadores celulares. Por tanto, se demuestra claramente que la transducción dirigida a la entrada en la célula que emplea las partículas de vector lentivírico de la presente invención es una herramienta particularmente eficaz para la transferencia de genes altamente selectiva hacia células específicas.

Ejemplo 7: Partículas de vector lentivírico dirigidas a la entrada en la célula, dirigidas a células que expresan CD34

20 En la siguiente serie de experimentos se investigó la capacidad para dirigirse a células que muestran marcadores específicos distintos de CD46 y SLAM, utilizando un tercer conjunto de partículas de vector pseudotipificado. Estas comprenden una proteína H de fusión mutada y quimérica que muestra ejemplarmente scFvCD34 en su ectodominio, es decir, un anticuerpo monocatenario dirigido contra la molécula de CD34.

25 El ADN de scFvCD34 se amplifica con PCR a partir de ADNc, que se ha sometido a una transcripción inversa a partir de ARNm extraído de la línea celular de hibridoma anti-My-10 (ATCC HB-8483) que produce un anticuerpo monoclonal contra CD34. La amplificación se realiza según el protocolo del sistema de anticuerpos de fagos recombinantes/módulo de scFv de ratón (Amersham Biosciencias), en el que se introduce un sitio de restricción *Sfi*I y *Not*I, respectivamente, en la región codificadora N- y C-terminal, respectivamente. De esta forma, la región codificadora de scFvCD20 en el plásmido pCG-HmutscFvCD20 Δ 18 puede ser reemplazada por el ADN de scFvCD34. Para este fin, el scFvCd34 y el ADN plasmídico se rompen con las enzimas de restricción *Sfi*I y *Not*I (disponibles en el mercado en NEB) en un tampón apropiado durante 5 h a 37 °C y 3 h a 50 °C. Las etapas de clonación adyacentes se describen en el ejemplo 1.

35 Las partículas de vector lentivírico pseudotipificado se generaron básicamente como se describió en el ejemplo 2. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con el plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, el plásmido de transferencia que codifica GFP, y los dos plásmidos que codifican HmutscFvCD34 Δ 18 y Fc Δ 30, respectivamente. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares, que contienen los vectores de VIH-1 pseudotipificados, se filtraron, se concentraron y se emplearon para la transducción de células KG-1a, que expresan CD34 sobre su superficie celular, y células A301, que expresan CD46 y SLAM, pero no CD34. La transducción se realiza básicamente como se describe en el experimento 3. Como controles positivo y negativo, se empleó el sobrenadante celular concentrado de células HEK-293T cotransfectadas con el plásmido encapsulante, el plásmido de transferencia y el plásmido que codifica VSV-G y MLV Env_{eco}, respectivamente.

40 Para el análisis de la transferencia de genes, las células transducidas se analizarán para la fluorescencia de GFP y para la expresión del antígeno CD34 mediante un análisis FACS. Según los resultados del ejemplo 5 y 6, también el

tercer conjunto de partículas de vector dirigido a la entrada en la célula pseudotipificado deberían transducir de manera muy específica las células diana. Así, las partículas de vector pseudotipificado con HmutscFvCD34 Δ 18 y Fc Δ 30 deberían transducir células que expresan CD34, pero las titulaciones y la traducción deberían ser muy reducidas en células que no expresan dicho marcador de la superficie. Así, se espera que las células A301, que expresan CD46 y SLAM, no sean transducidas por las partículas de vector pseudotipificado con las proteínas HmutscFvCD34 Δ 18 y Fc Δ 30, mientras que será evidente una transducción clara y eficaz de las células KG-1a CD34-positivas.

El CD34 es un marcador de células pluripotenciales que, en la actualidad, se emplea para aislar y purificar células pluripotenciales hematopoyéticas. En otro experimento, se establecen como diana células primarias empleando células de leucaféresis humanas, que contienen menos del 1% de células pluripotenciales hematopoyéticas CD34-positivas. Para este fin, las células de leucaféresis se transducen con las partículas de vector pseudotipificado con HmutscFvCD34 Δ 18 y Fc Δ 30. Cuarenta y ocho horas después las células se tiñen para la expresión de CD34 utilizando un anticuerpo dirigido contra CD34 acoplado directamente a un fluoróforo adecuado. Para este fin, las células transducidas se centrifugan durante 2 min con 3.500 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. El sedimento después se resuspende en 1 ml de tampón de lavado FACS (PBS, FCS al 2%, NaN₃ al 0,1%) y se centrifuga igual que antes. Después, el sedimento se incuba durante 1 h a 4 °C en la oscuridad en una dilución apropiada de anticuerpo anti-CD34. Después, las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, y se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS. Después, las células se resuspendieron en 200 μ l de PBS/paraformaldehído al 1% y se analizaron mediante FACS para la expresión de GFP y CD34. Tal como se esperaba, solo las células CD34-positivas serán GFP-positivas, mientras que los demás tipos de sangre presente en las células de leucaféresis no son transducidos.

Para demostrar que las células transducidas son, en efecto, células pluripotenciales hematopoyéticas que tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células sanguíneas, se realiza un experimento de reconstitución de médula ósea. Para este fin, ratones SCID son letalmente irradiados y después transplantados con las células CD34-positivas transducidas. Comenzando 3,5 semanas después del trasplante y continuando durante al menos 16 semanas después del trasplante, se recoge sangre periférica de la vena de la cola y se analiza mediante FACS para la expresión de GFP. Tal como se esperaba, la mayoría de las células sanguíneas han sido reconstituidas a partir de las células CD-positivas transducidas, lo cual puede seguirse mediante el gen marcador GFP.

Así, también puede utilizarse un tercer conjunto de partículas de vector pseudotipificado, que comprenden una proteína H de fusión mutada y quimérica que muestra ejemplarmente scFvCD34 en su ectodominio, como una herramienta eficaz para la transferencia de genes altamente selectiva hacia células específicas.

Ejemplo 8: Muerte de células dirigida empleando partículas de vector lentivírico dirigidas contra células que expresan CD20

El experimento descrito demuestra que si se utilizan las partículas de vector lentivírico dirigidas de esta invención, es posible matar específicamente células diana en una mezcla de diferentes células.

Las partículas de vector utilizadas para este experimento se pseudotipificaron con una proteína F truncada que también comprende una proteína H de fusión truncada, mutada y quimérica que muestra ejemplarmente un anticuerpo monocatenario contra CD20 en su ectodominio. La mutación de la proteína H de MeV comprende las cuatro mutaciones puntuales Y481A, R533A, S548L y F549S que impiden las interacciones productivas con CD46 y SLAM, respectivamente. Para la muerte de las células, estas partículas de vector tienen encapsulado un gen que codifica una proteína de fusión de un mutante hipersensible de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (TK39) y una versión truncada citoplásmica del antígeno de la superficie celular CD34 (CD34TK39). La timidina quinasa metaboliza el fármaco inactivo ganciclovir para producir un derivado químico que es tóxico para las células en división. Además, las células transducidas pueden detectarse mediante la expresión de CD34. En paralelo, como control, se aplicaron las mismas partículas de vector que tienen encapsulado el gen *gfp*.

Para la generación de las partículas de vector se realizó una transfección con fosfato de calcio. Veinticuatro horas antes de la transfección se sembraron $6,5 \times 10^6$ células HEK-293T en un matraz T75. Una hora antes de la transfección se intercambió el medio de las células contra 7 ml de medio fresco (DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%). Se cotransfectaron 2,0 μ g del plásmido que codifica HmutscFvCD20 Δ 18, y 6,0 μ g del plásmido que codifica Fc Δ 30, con 6,72 μ g del plásmido encapsulante, y 11,27 μ g del plásmido de transferencia. Este último es SEW o S-CD34TK39-W, en el que el gen *gfp* de SEW es reemplazado por el gen *cd34tk39* derivado del plásmido M71tCD34tk39m (Junker *et al.*, 2003, Gene Therapy, 10, pp. 1189-1197). El ADN plasmídico se rellena con H₂O (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) hasta 450 μ l. Después se añaden 50 μ l de una disolución de CaCl₂ 2,5 M (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania). Mientras se agita en vórtice la disolución de ADN-CaCl₂, se añaden gota a gota 500 μ l de 2x tampón HBS (NaCl 281 mM; HEPES 100 mM; Na₂HPO₄ 1,5 mM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania)). El precipitado suspendido después se trasladó a las células HEK-293T. Después de aproximadamente 17 h de incubación, el medio se reemplaza por 12 ml de medio fresco. Veinticuatro horas después, los 12 ml de sobrenadante celular, que contiene las partículas de vector lentivírico pseudotipificado, se filtraron (filtro de 0,45 μ m) y se concentraron mediante una centrifugación a 3063 g y 4 °C durante al menos 24 h.

El sedimento se resuspendió en 120 μ l de medio sin FCS y se empleó para la transducción de una mezcla de células Raji CD20-positivas (ATCC CCL-86) y células K-562 CD20-negativas (ATCC CCL-243).

Las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30 con un gen *gfp* encapsulado o con un gen *cd34tk39* encapsulado se diluyeron 1:5 en 300 μ l de medio (RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%) que contiene una mezcla de 2 x 10³ células Raji CD20+ y 2 x 10³ células K-562 CD20-. Esta mezcla de transducción, que incluye también 1,2 μ g de sulfato de protamina, se trasladó a un único pocillo de una placa de 48 pocillos y después se centrifugó a 860 g durante 1 h a 32 °C. Después de 2 h más de incubación a 37 °C se añadieron 700 μ l de medio por pocillo. Cinco días después de la transducción, las células transducidas con *gfp* se tiñeron contra CD20 (anti-CD20 humano de ratón/PE-Cy5; BD Pharmingen™, Heidelberg, Alemania) y las células transducidas con *cd34tk39* contra CD20 y CD34 (anti-CD34 humano de ratón/PE; EuroBioSciences GmbH, Friesoythe, Alemania). Para este fin, las células se centrifugaron durante 2 min a 3.500 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. Los sedimentos después se resuspendieron en 1 ml de tampón de lavado FACS (PBS, FCS al 1%, NaN₃ al 0,1%) y se centrifugaron igual que antes. Después, los sedimentos se incubaron durante 1 h a 4 °C en la oscuridad en una dilución apropiada de anticuerpo anti-CD20 (las células transducidas por las partículas de vector con el gen *gfp* encapsulado) o anti-CD20 y anti-CD34 (las células transducidas por las partículas de vector con el gen *cd34tk39* encapsulado) directamente acoplado al fluoróforo apropiado. Después, las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS/paraformaldehído al 1%. Después, se midieron los porcentajes de las células CD20/GFP-doble positivas y CD20/CD34-doble positivas mediante FACS (momento del tiempo 0 h en la figura 18). Después, la mitad de las células transducidas se incubaron en ganciclovir 10 μ M (GCV; Cymeven, Roche) que contiene medio (se intercambia por medio que contiene GCV fresco cada 24 h), mientras que la otra mitad se deja como control en el medio sin GVC. En diferentes momentos, las células se tiñeron con los respectivos anticuerpos y se midieron las células doble positivas mediante FACS (sistema de citometría de flujo Dako Galaxy, véase la figura 18).

La figura 18 demuestra que mediante la utilización de partículas de vector dirigido anti-CD20 con el gen *gfp* encapsulado (a) o con el gen *cd34tk39* encapsulado (b), la fracción de células CD20-positivas fue selectivamente transducida. Aparecían aproximadamente 20% de células doble positivas CD20/GFP y 30% de CD20/CD34, mientras que solo fueron transducidas aproximadamente 1-2% de células CD20-negativas. A lo largo del tiempo no se produjeron grandes cambios en el patrón de transducción visible, lo cual demuestra la integración estable de los genes transferidos y la viabilidad de las células transducidas. También se verificó que las células transducidas no presentaban ventaja ni desventaja de crecimiento. Tal como se esperaba, la incubación con GCV no influye en la fracción de células CD20/GFP-doble positivas (véase la figura 18a), lo cual demuestra que GCV, por sí mismo, no tiene un efecto tóxico sobre las células. Por contraste, la fracción de células CD20-positivas transducidas con la proteína de fusión CD34TK39 fue destruida de forma muy eficaz y selectiva por la incubación con GCV (véase la figura 18b). De aproximadamente 30% de las células doble positivas del principio, solo quedaron aproximadamente 12% después de 48 h, y después de 6 días casi todas las células doble positivas fueron destruidas.

Así, las partículas de vector pseudotipificado de la invención son una herramienta eficaz para matar selectivamente células diana específicas en una mezcla de células diferentes. Preferiblemente, las partículas de vector pseudotipificado de la invención, por tanto, pueden utilizarse la terapia del cáncer, tal como, por ejemplo, el linfoma de Burkitt.

Además, la destrucción selectiva de células tumorales CD20-positivas puede demostrarse *in vivo* en un modelo de tumor murino. Para este fin, ratones SCID-X1 se inyectarán por vía subcutánea con 1 x 10⁶ células HT1080 en el flanco izquierdo, y 1 x 10⁶ células HT1080-CD20 en el flanco derecho. Aproximadamente una semana después, se inyectarán por vía intravenosa 10⁸ partículas de vector pseudotipificado dirigido a CD20, seguido de una inyección sistémica diaria de ganciclovir. El crecimiento tumoral se seguirá a diario determinando el volumen tumoral. Se espera que el tumor CD20-positivo sea significativamente inhibido con respecto al crecimiento celular, mientras que el tumor CD20-negativo crecerá sin verse afectado.

Ejemplo 9: Identificación de neuronas positivas al receptor AMPA en cortes de hipocampo en condiciones en vivo

En los protocolos de neurología para cultivos de cortes organotípicos de cerebro de ratón está bien establecido el cultivo de cortes completos durante varias semanas y el análisis de células individuales dentro del tejido, por ejemplo, como registros de electrofisiología. Hasta la fecha no existen métodos disponibles para identificar tipos definidos de neuronas en el corte de tejido bajo condiciones en vivo antes de realizar el análisis. La transducción de genes marcadores selectiva con los vectores lentivíricos pseudotipificados de esta invención puede marcar a una única célula basándose en la expresión de un marcador de la superficie celular elegido que se emplea para la transferencia de genes.

En este ejemplo, se identifican neuronas positivas al receptor AMPA en cultivos de cortes de hipocampo. Para este fin se generó una partícula de vector pseudotipificado lentivírico que muestra un scFv dirigido contra el receptor de glutamato-4 (GluR4). El anticuerpo monocatenario se generó mediante amplificación con PCR de las regiones codificadoras de las cadenas ligera y pesada de un fragmento Fab dirigido contra GluR4. Este fragmento Fab está codificado por el plásmido Fab7-Origami (Jespersen *et al.*, 2000, Eur. J. Biochem., 267 (5), pp. 1382-1389). Se emplearon los cebadores Fab7VL(+) 5'-ATCCCTCGGGTGGCGGAGGCTCGGACATTGTGATGACCC-3' y Fab7VL(-

) 5'-TTTTCTTTTTCGCGCCGACGCC GTTTTATTTTC-3' para la amplificación de la cadena ligera, y los cebadores Fab7VH(+) 5'-GCTTGGCCAGCCGCCATGGAGGTGAAGCTGGTG-3' y Fab7VH(-) 5'-TCCCC CGAGCCACCTCCGCGGATCCACCGCCACCTGAGGAGACGGTGAC-3' para la amplificación de la cadena pesada. Así, se introdujo un sitio de restricción *Aval* y un conector de glicina-serina en el extremo 3' de la cadena pesada y el extremo 5' de la cadena ligera, respectivamente. Los dos fragmentos se acoplaron y se clonaron en los sitios de restricción *SfiI/NotI* de pCG-HmutscFvCD20Δ18 (descrito en el ejemplo 1), reemplazando con ello al anticuerpo monocatenario dirigido contra CD20 y produciendo el plásmido pHmutscFvGluR4Δ18.

Las partículas de vector lentivírico pseudotipificado se generaron básicamente como se describió en el ejemplo 5. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con 6,72 μg de plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, 11,27 μg de plásmido de transferencia que codifica GFP, y 2,0 μg de plásmido que codifica HmutscFvGluR4Δ18, y 6,0 μg de plásmido que codifica FCΔ30. Esto se realizó mediante una transfección con fosfato de calcio, según se describe en el ejemplo 2. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares, que contienen las diferentes partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado, se filtraron y se concentraron según se describió en el ejemplo 2.

Para verificar una transferencia de genes dependiente de GluR4 de estos vectores, las partículas de vector se utilizaron para la transducción de células HT1080-GluR4, que expresan de modo estable GluR4, y las células HT1080 de origen como control. Para la transducción se sembraron $1,0 \times 10^5$ células HT1080 y $1,0 \times 10^5$ células HT1080-GluR4 en diferentes pocillos de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las disoluciones madre del vector se diluyeron en etapas de 1:10, y un total de 250 μl de las diluciones, que incluyen 2,0 μg de polibreno, se añadieron a cada pocillo, se incubaron durante 2,5-3 h y se sustituyó por 1 ml de medio fresco (DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%). Después de 48 h, las células se analizaron bajo un microscopio de fluorescencia (véase la figura 19a) y mediante FACS. Para este fin, las células se desprendieron mediante una incubación con 100 μl de disolución de PBS-tripsina. Después se añadió 1 ml de tampón de lavado FACS (PBS, FCS al 1%, NaN₃ al 0,1%) y después las células se sedimentaron mediante una centrifugación durante 2 min a 3.500 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. Después, los sedimentos se incubaron durante 1 h a 4 °C en una dilución apropiada de un anticuerpo anti-c-myc (anti-c-myc clon 9E10, Roche), que detecta el marcador c-myc en el ectodominio de GluR4. Después, las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS y se incubaron durante 1 h a 4 °C en la oscuridad en una dilución apropiada de un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón directamente acoplado con el fluoróforo R-ficoeritrina (PE) (fragmento F(ab')₂ anti-IgG de ratón-PE, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania). Después, las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS y se resuspendieron en 200 μl de PBS/paraformaldehído al 1%. Después, se determinó la población de células GluR4/GFP-doble positivas mediante FACS (véase la figura 19b).

Los datos demuestran que los vectores dirigidos a GluR4 en efecto entran en las células a través del receptor de glutamato. Las células HT1080 que expresan GluR4 fueron transducidas con eficacia, mientras que las células HT1080 de origen que fueron transfectadas con el plásmido vacío pcDNA3.1(-) (Invitrogen), y por tanto no expresan el receptor, no pueden ser transducidas por el vector dirigido anti-GluR4 (véase la figura 19a). Los datos de FACS confirman la foto microscópica (véase la figura 19b). Así, está disponible un vector dirigido a un receptor AMPA.

Después, este vector se utilizará para la transducción de cultivos de cortes de hipocampo. Para la preparación de los cultivos de cortes de hipocampo se ha publicado un protocolo detallado por Gogolla *et al.*, 2006 (Nature Protocols 1, 1165). Los cortes de hipocampo preparados a partir de ratones de 6-9 días de edad se cultivan en MEM suplementado con penicilina/estreptomycin, suero de caballo termoinactivado al 25%, Tris 10 mM, y tampón HBSS al 25% en un incubador de cultivos celulares a 35 °C y CO₂ al 5%. Para la transducción, se añaden 10⁶ t.u. de la disolución madre de las partículas de vector al cultivo de tejido y se incubó durante la noche. Al día siguiente, el medio se cambia. Después de 24 h más, se analiza la expresión de GFP en el cultivo del corte bajo un microscopio de fluorescencia.

El patrón de tinción de GFP observado después se compara con el patrón de tinción obtenido mediante una tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-GluR4 (anticuerpo policlonal anti-receptor de glutamato-4 de conejo, Chemicon). Se espera que el patrón de las células GFP-positivas se solape en gran medida con el patrón de las células GluR4-positivas obtenido mediante tinción inmunohistoquímica.

Así, se espera que las partículas de vector pseudotipificado de la invención sean una herramienta eficaz para identificar tipos celulares definidos en poblaciones de células, por ejemplo, cortes de tejidos, bajo condiciones en vivo.

Ejemplo 10: Construcción del banco de partículas de vector lentivírico pseudotipificado con diferentes fusiones de anticuerpos monocatenarios-H

La generación del banco de scFv mostrado sobre las partículas de vector lentivírico pseudotipificado es fundamentalmente un procedimiento en dos etapas, que incluye: i) la clonación del banco de plásmidos pHmutΔ19-scFvlib; y ii) la generación del banco de partículas de vector. Un prerrequisito fundamental para la selección de un banco de presentación retrovírico es el acoplamiento del genotipo y el fenotipo, que en este caso significa que la

región codificadora para cada proteína de fusión scFv-H debe ser encapsulada por la partícula de vector que tenga la proteína scFv-H particular incorporada en su membrana. Por tanto, el banco de H-scFv debe clonarse en un vector de transferencia lentivírico que, además, codifique un marcador seleccionable, tal como, por ejemplo, el gen de resistencia a neomicina.

5 Así, una primera etapa en la clonación del banco será la construcción de un vector de transferencia lentivírico que codifica una proteína de fusión scFv-H y un gen de resistencia a neomicina. Como vector de transferencia, puede utilizarse el plásmido pHGIN, que previamente ha sido generado en el laboratorio de los inventores (Merten *et al.*, 2005). En pHGIN, la secuencia codificadora de la proteína Env retroviral puede intercambiarse por la secuencia codificadora de CD20-Hmut Δ 19, que puede retirarse del plásmido pHmutCD20 Δ 19 mediante una digestión de restricción con PaeI y SpeI. El plásmido resultante, pHmutCD20 Δ 19IN, sirve como plásmido de partida para la clonación del banco.

10 El repertorio de scFv puede subclonarse a partir del banco de presentación de fagos Griffin.1, que codifica un gran repertorio de anticuerpos monocatenarios humanos sintéticamente diversificados (Griffiths *et al.*, 1994; EMBO J., 13, 3245-3260). Aproximadamente 33 μ g del ADN plasmídico de este banco, que está disponible en MRC de Cambridge (Reino Unido) se digieren con 150 U de NotI y 75 U de SfiI en un volumen total de 225 μ l en tampón NEB 2 y 1x BSA durante 4 h a 37 °C y 3 h a 50 °C. El banco de scFv que codifica el fragmento se purifica a partir de un gel de agarosa al 1,5% con el kit QiaexII según las instrucciones del fabricante (Qiagen), con la excepción de que la elución final se realiza en un total de 80 μ l de H₂O. La cantidad de fragmento purificado se calcula en un gel de agarosa. En paralelo, pHmutCD20 Δ 19IN se digiere bajo las mismas condiciones con SfiI y NotI, y el esqueleto del plásmido se purifica mediante una cromatografía en gel de agarosa, según se describió para el repertorio de scFv. Ambos fragmentos de ADN después se acoplan en una proporción de 1:3 (scFv:esqueleto) en un volumen total de 150 μ l que incluye 2 μ l de ligasa T4, 18 μ l de PEG 8000 (al 40%), y 15 μ l de 10x tampón ligasa durante 17 h a 16 °C. A la mañana siguiente, se añade 1 μ l de ligasa T4 y se incuba durante 3 h más a 16 °C. El producto del acoplamiento entonces se purifica mediante una extracción con fenol/cloroformo, seguida de una precipitación en etanol (se añaden 15 μ l de NaAc 3 M y 825 μ l de etanol, y se incuba durante la noche a -20 °C). El producto del acoplamiento precipitado se lava en 1 ml de etanol al 70% enfriado en hielo, se seca y se resuspende en 15 μ l de H₂O. Para la electroporación en bacterias *E. coli* (ElectroTenblue, disponible en Stratagene) se mezcla 1 μ l de acoplamiento con 40 μ l de células electrocompetentes y se electropora en cubetas de 0,1 cm a 1,8 kV, 25 μ F, 200 Ω (constante de tiempo aproximadamente 4,2 ms). Este procedimiento se repite 10 veces. Después de la electroporación se recuperan las células en 1 ml de SOC y se incuba durante 1,5 h a 30 °C. Se emplea una parte alícuota pequeña de la suspensión bacteriana para determinar el número de células transformadas y así el tamaño del repertorio que cubre el banco. Debe obtenerse un número mínimo de 10⁷ clones en esta etapa. El resto de las células se cultivan en placas de agar grandes (medio LB con kanamicina y ampicilina). Después, se escogen aproximadamente 50 clones y se emplean para la preparación del plásmido y el análisis de las secuencias de las regiones codificadoras de scFv para demostrar la diversidad del banco. El resto de las colonias se raspan y se resuspenden en 24 ml de medio LB suplementado con ampicilina. Se generan 8 disoluciones madre de glicerol de 300 μ l cada una y se emplea el resto de las bacterias para inocular dos cultivos con un volumen de 250 ml cada uno. Al día siguiente, las bacterias se recolectan y el banco de plásmidos se prepara utilizando el kit Qiagen Maxi-Kit según las instrucciones del fabricante.

40 Para la generación del banco de partículas de vector, en una primera etapa se generan células productoras del banco de modo que cada célula codifique solo un único variante de scFv-H. Para este fin, se transfectan aproximadamente 7 x 10⁷ células 293T con el plásmido pHmut Δ 19-scFvlib (11,27 μ g) y el plásmido pCMV Δ R8.9 (6,72 μ g) mediante una transfección con fosfato de calcio bajo las condiciones descritas en el ejemplo 2, pero reemplazando el plásmido que codifica Fc Δ 30 por el plásmido que codifica la proteína VSV G pMDG (8 μ g). Dos días después de la transfección, el sobrenadante que contiene el banco de partículas de vector pseudotipificado se recolecta y se filtra a través de un filtro de 0,45 μ m. Se añade polibreno al filtrado hasta una concentración final de 8 μ g/ml antes de ser incubado con 7 x 10⁷ células HEK-293 durante 2 h. Después, el sobrenadante se intercambia contra medio fresco. El día dos después de la transducción, las células HEK-293 se incuban con medio que contiene G418 1 mg/ml y FCS al 20% durante 7 días. Las células supervivientes portan la información genética para el banco de vectores lentivíricos que muestran scFv que puede ser encapsulado en partículas de vector que se liberan en el sobrenadante del cultivo celular tras la transfección de las células con los plásmidos pCG-Fc Δ 30 y pCMV Δ R8.9 (véase el ejemplo 11 para más detalles).

Ejemplo 11: Selección de las células HT1080 que expresan CD20 utilizando el banco

55 Para seleccionar el banco de partículas de vectores lentivíricos scFv para anticuerpos dirigidos contra CD20, se sembraron 5 x 10⁷ células transducidas con el banco, generado como se describe en el ejemplo 10, sobre el fondo de una cámara de transpocillos (Corning). Al día siguiente, las células son transfectadas con 10 μ g de pCMV Δ d8.9 y 14 μ g de pCG-Fc Δ 30 para iniciar la liberación de las partículas de vector. Después de otro día se aplican 5 x 10⁶ células HT1080-CD20 (véase el ejemplo 5), sembradas sobre una membrana permeable el día anterior, a la cámara de transpocillos para iniciar el cocultivo con las células productoras del banco. Después de 3 días de cocultivo, las células HT1080-CD20 se desprenden de la membrana permeable mediante tripsinización extendida (incubación

durante 6 min) y se siembran en un matraz de cultivo T175. Después de 24 h, las células se tratan con medio que contiene neomicina durante 7 días más. Las colonias supervivientes después se emplean para iniciar el siguiente ciclo de selección sembrándolas sobre el fondo de una cámara de transpocillos como se describió anteriormente. Después de la ronda de selección final, se prepara el ADN genómico de las células resistentes a neomicina, y se clonan y secuencian las regiones codificadoras de scFv. Después se generan partículas de vector lentivírico pseudotipificado con el scFv clonado, según se describe en el ejemplo 1. Las partículas de vector lentivírico pseudotipificado con las proteínas scFv-H seleccionadas después se ensayan para la transducción de células HT1080 frente a HT1080-CD20. Las proteínas de scFv que median en la transducción eficaz de células HT1080-CD20, pero no de células HT1080, deben dirigirse contra el antígeno CD20.

10 Ejemplo 12: Identificación del antígeno del anticuerpo monocatenario 7A5

En la siguiente serie de experimentos se demostrará la capacidad para identificar un antígeno para un anticuerpo monocatenario concreto con especificidad desconocida. El anticuerpo monocatenario 7A5 ha sido previamente identificado seleccionando un banco de presentación de fagos para la unión a la superficie de linfocitos T humanos (Engelstaedter *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, 11, 293). Aunque se ha establecido que su antígeno está presente sobre la superficie de linfocitos T humanos, pero está ausente de otros tipos de células humanas, entre estas las células HEK-293T y las células HT1080, la identidad del antígeno es desconocida.

Para identificar el antígeno, se generan vectores lentivíricos pseudotipificados según esta invención que muestran 7A5 sobre la proteína H. El ADNc de 7A5 está disponible en plásmidos de expresión, a partir de los cuales puede subclonarse con facilidad en pCG-HmutscFvCD20Δ19, intercambiando así el scFv de CD20 por 7A5. Después se generarán vectores según el ejemplo 5, pero se empleará un vector de transferencia biscistrónico que codifica un gen de resistencia a neomicina (neo^r) y el gen GFP, de modo que las partículas de vector resultantes transferirán ambos genes marcadores en células positivas al antígeno. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectan con el plásmido encapsulante que codifica gag/pol de VIH-1, el plásmido de transferencia que codifica GFP/neo^r, y los dos plásmidos que codifican Hmut7A5Δ19 y FcΔ30. Después de 48 h, el sobrenadante celular, que contiene los vectores de VIH-1 pseudotipificados, se filtra y se concentra. Para ensayar la transducción selectiva del gen neo^r en linfocitos T, se incuban células A301 y líneas celulares negativas al antígeno, tales como HT1080 y HEK-293T, con las partículas de vector y se ensaya la transferencia de los genes neo^r y GFP añadiendo neomicina al medio de cultivo celular (0,5-1 mg/ml), o analizando las células para la expresión de GFP bajo un microscopio de fluorescencia. Se espera que las células HT1080 y HEK-293T sigan siendo negativas para la expresión de ambos marcadores, mientras que las células A301 se convertirán en positivas.

En la siguiente etapa, se empleará un banco de expresión de ADNc de linfocitos T humanos que puede encapsularse en un vector MLV para transducir y expresar el banco de ADNc en células HT1080 o HEK-293T. Los métodos para preparar ADNc y para construir bancos de expresión de ADNc son muy conocidos en la técnica, y cualquiera de estos métodos puede utilizarse (véase Sambrook *et al.*, 1989). Como alternativa, pueden adquirirse en el mercado bancos de ADNc encapsulable retrovíricos de tejido de linfocitos T humanos. Las células transducidas con el banco de ADNc después se incuban con el vector lentivírico pseudotipificado con 7A5. Se espera que las células que expresan el antígeno 7A5 en la población de células transducidas se convertirán en positivas a GFP y neo^r. Por tanto, estas células pueden seleccionarse con neomicina o clasificarse mediante clasificación de células activada por fluorescencia. Después, las células se amplifican bajo condiciones de cultivo celular convencionales. Por último, el ADNc expresado en las células seleccionadas puede clonarse y secuenciarse para identificar el antígeno 7A5 mediante búsqueda en el banco de genes.

Ejemplo 13: Producción, aislamiento y titulación de partículas de vector lentivírico pseudotipificado con proteínas F y H que también tienen colas citoplásmicas truncadas

Se produjeron partículas de vector lentivírico pseudotipificado mediante la cotransfección de células HEK-293T con el plásmido encapsulante pCMVΔR8.9 que codifica los genes gag y pol de VIH-1, el plásmido de transferencia pSEW que codifica un gen indicador gfp, y los dos plásmidos que codifican los variantes de las proteínas H y F truncadas de modo diferente, respectivamente. En el caso de la proteína H que surge de HcΔ20, se generaron variantes con colas C truncadas en serie mediante mutagénesis por PCR de pCG-H, según se describió en el ejemplo 1.

Para la generación de los vectores pseudotipificados, se sembraron $6,5 \times 10^6$ células HEK-293T (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%) en un matraz T75 24 h antes de la transfección. Una hora después de la transfección, el medio de las células se intercambió contra 5 ml de medio fresco. Se cotransfectaron 7 μg del plásmido pCGFcΔ20, 1,0 μg del plásmido que codifica el respectivo variante de la proteína H (pCGHcΔ21 a pCGHcΔ24, pCGHcΔ26+6A o pCGHcΔ30+10A), 6,72 μg del plásmido pCMVΔR8.9, y 11,27 μg de of pSEW, mediante una transfección con fosfato de calcio. El ADN plasmídico se rellenó con H₂O (Sigma; W-3500) hasta 450 μl. Después se añadieron 50 μl de una disolución de CaCl₂ 2,5 M (Sigma, C7902). Mientras se agita en vórtice la disolución de ADN-CaCl₂, se añaden gota a gota 500 μl de 2x tampón HBS (NaCl 281 mM (Sigma, S7653); HEPES 100 mM (Sigma, H3375); Na₂HPO₄ 1,5 mM (Sigma, S0876)). El precipitado suspendido después se trasladó a las células HEK-293T. De tres a cuatro horas después se añaden 5 ml de medio fresco y 15 h después el medio se reemplaza por 12 ml de medio fresco.

5 Veinticuatro horas después, los 12 ml de sobrenadante celular que contienen las partículas de vector lentivírico pseudotipificado se filtran (filtro de 0,45 µm) y se emplean 300 µl directamente para la transducción de células HT1080. El resto del sobrenadante se concentró mediante centrifugación a 3600 rpm (multífuga Heraeus 3S-R) y 4 °C durante al menos 16 h. El sedimento después se resuspendió en 120 µl de medio sin suero (DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l).

10 Para la titulación de las disoluciones madre de partículas de vector no concentradas, se sembraron 1,0 x 10⁵ células HT1080 (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%) en un único pocillo de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las disoluciones madre de vector se diluyeron en serie en etapas de 1:10 y después se añadió un total de 250 µl de las diluciones, que incluyen 2,0 µg de polibreno, a cada pocillo, se incubó durante 2,5-3 h y se sustituyó por 1 ml de medio fresco. Después de 48-72 h se calcularon las titulaciones determinando el número de células fluorescentes verdes por pocillo realizando el recuento en un microscopio de fluorescencia. Para el recuento se selecciona una dilución en la que significativamente menos que cada célula ha sido transducida. Para calcular el número de partículas de vector transductoras por ml, las células contadas por pocillo se multiplicaron por el factor de dilución y el factor 4 (empleando 250 µl x 4 = 1 ml).

15 Las titulaciones se resumen en la tabla 6.

Tabla 6: Titulaciones de partículas de VIH-1 pseudotipificadas con las proteínas FcΔ30 de MeV y H de MeV que también tienen colas citoplásmicas truncadas en células HT1080

Proteínas de la envuelta	HT1080 [t.u./ml] ^a
FcΔ30 HcΔ21	1,5 x 10 ³
FcΔ30 HcΔ22	1,4 x 10 ²
FcΔ30 HcΔ23	1,3 x 10 ²
FcΔ30 HcΔ24	88
FcΔ30 HcΔ26+6A	0
FcΔ30 HcΔ30+10A	0
^a Se emplearon sobrenadantes de células no concentrados.	

20 Las partículas de vector producidas en presencia de FcΔ30 y un variante de la proteína H que también tiene una cola citoplásmica truncada no muestran o muestran unas titulaciones muy bajas en las células HT1080. Por consiguiente, otro truncamiento de la cola citoplásmica de la proteína H conduciría a unas titulaciones menores de los pseudotipos. Esto puede ser debido al hecho de que la función auxiliar de la fusión de la proteína H se pierde cuando la cola citoplásmica está truncada en más de 14 aminoácidos (Moll *et al.*, 2002, *J. Virol.*, 76 (14), pp. 7174-7186).

25 En el caso de la proteína F, se introduce un codón de fin mediante mutagénesis puntual en pCG-F (según se describe en el ejemplo 1) para producir una proteína F en la que solo queda un aminoácido (arginina) en la cola citoplásmica (FcΔ32), y después este variante de la proteína F más truncado se ensaya para la potenciación de la pseudotipificación.

Ejemplo 14: Transducción de células B humanas primarias por las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18 y FcΔ30

30 Para un uso clínico es importante que las partículas de vector de esta invención puedan transducir no solo líneas celulares, sino también células humanas primarias. Este ejemplo demuestra que las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificadas con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 pueden transducir con eficacia células B CD20-positivas humanas primarias.

35 Se generaron partículas de vector lentivírico pseudotipificadas según se describe en el ejemplo 5. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con 6,72 µg de plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, 11,27 µg de plásmido de transferencia que codifica GFP, 2,0 µg de plásmido que codifica HmutscFvCD20Δ18, y 6,0 µg de plásmido que codifica FcΔ30. Esto se realizó mediante una transfección con fosfato de calcio, según se describe en

el ejemplo 2. Como control positivo se produjeron partículas de vector pseudotipificado con VSV-G. Para este fin, se cotransfectaron 4,55 µg del plásmido que codifica la proteína de la envuelta VSV-G, 8,45 µg del plásmido encapsulante, y 13,00 µg del plásmido de transferencia. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares, que contienen las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado, se filtraron, se concentraron (según se describió en el ejemplo 2) y después se emplearon para la transducción de células B CD20-positivas humanas primarias.

Las células B primarias se aislaron de PBMC humanas frescas con el kit de aislamiento negativo de células B Dynal® (Invitrogen) siguiendo el manual de instrucciones. Después, las células B aisladas se trasladaron a un único pocillo de una placa de 24 pocillos y se incubaron durante 48 h en RPMI 1640 suplementado con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, SP al 0,5%, Hepes 25 mM, así como ligando de CD40 300 ng/ml, IL-2 50 ng/ml, IL-4 10 ng/ml, e IL-10 10 ng/ml. Mediante la incubación con estas citoquinas, las células B se activan, lo cual hace que sean susceptibles a la transducción por las partículas de vector lentivírico.

Para la transducción de las células B humanas primarias, se empleó una MOI de 2, y para las partículas de vector pseudotipificado con VSV-G además una MOI de 150. Para el prerrevestimiento, la mitad de las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 o VSV-G concentradas se diluyeron en 120 µl de medio (medio + citoquinas, véase anteriormente) y se trasladaron a un único pocillo de una placa de 48 pocillos revestida con fibronectina. Esta placa después se centrifugó a 860 g durante 20 min a 4 °C. Mientras, la otra mitad de las partículas de vector se diluyó en 180 µl de medio (suplementado con 1,2 µg de sulfato de protamina) que contiene 5 x 10⁴ células B humanas primarias aisladas y se añade a los pocillos con las respectivas partículas de vector prerrevestido. Después se realizó una etapa de centrifugación a 430 g durante 90 min a 32 °C. Después de 2 h más de incubación a 37 °C en el incubador se añadieron 700 µl de medio + citoquinas (véase anteriormente) por pocillo. Para verificar que el aislamiento había funcionado bien y que las células transducidas realmente eran células B CD20-positivas, 72 h después de la transducción las células se tiñeron contra CD20 (anti-CD20 humano de ratón/PE-Cy5; BD Pharmingen™, Heidelberg, Alemania) y CD19 (anti-CD19 humano de ratón/PE; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), que son ambos marcadores de células B. Para este fin, las células se centrifugaron durante 2 min a 3.000 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. Los sedimentos después se resuspendieron en 1 ml de tampón de lavado FACS (PBS, FCS al 1%, NaN₃ al 0,1%) y se centrifugaron igual que antes. Después, los sedimentos se incubaron durante 1 h a 4 °C en la oscuridad en una dilución apropiada de anticuerpos anti-CD20 y anti-CD19 directamente acoplados con un fluoróforo apropiado. Después, las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS y se resuspendieron en 200 µl de PBS/paraformaldehído al 1%. Después, se determinó la fracción de células CD20/CD19/GFP-triple positivas mediante FACS (sistema de citometría de flujo Dako Galaxy, véase la figura 20).

El aislamiento de las células B a partir de PBMC humanas frescas con el kit de aislamiento negativo de células B Dynal® (Invitrogen) había funcionado bien, puesto que casi todas las células eran CD20/CD19-doble positivas y, por tanto, son células B (véase la figura 20). Con las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificadas con VSV-G, aproximadamente 20% de estas células B CD20/CD19-positivas se convirtieron en GFP-positivas cuando se emplea una MOI de 2 (véase la figura 20a). De forma notable, las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 transducían las células B CD20/CD19-doble positivas con una eficacia de aproximadamente 70% (véase la figura 20b). Incluso cuando se emplea una MOI de 150, solo se obtiene aproximadamente 40% de células GFP-positivas con las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con VSV-G (véase la figura 20c), lo cual demuestra que las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 descritas en esta invención pueden transducir células B humanas primarias con una eficacia mayor que los vectores pseudotipificados con VSV-G. Esto sugiere la aplicación de estos vectores, por ejemplo, para el tratamiento del linfoma de Burkitt u otras enfermedades, en las que es importante una alta eficacia de la transducción de células B CD20-positivas.

Ejemplo 15: Transducción selectiva de células B en linfocitos humanos primarios por partículas de vector de VIH-1 pseudotipificadas con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30

Este ejemplo ilustra que las partículas de vector de la invención son capaces de mediar en una transferencia de genes selectiva hacia una subpoblación de linfocitos humanos primarios. Las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20Δ18/FcΔ30 se emplearon para la transducción de una mezcla de células B CD20-positivas humanas primarias y células T CD3-positivas humanas primarias.

Se generaron las partículas de vector lentivírico pseudotipificado como se describió en el ejemplo 5. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con 6,72 µg de plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de VIH-1, 11,27 µg de plásmido de transferencia que codifica GFP, y 2,0 µg de plásmido que codifica HmutscFvCD20Δ18, y 6,0 µg de plásmido que codifica FcΔ30. Esto se realizó mediante una transfección con fosfato de calcio, según se describe en el ejemplo 2. Como control positivo se emplearon partículas de vector pseudotipificado con VSV-G. Para este fin, se cotransfectaron 4,55 µg del plásmido que codifica la proteína de la envuelta VSV-G, 8,45 µg del plásmido encapsulante, y 13,00 µg del plásmido de transferencia. Después de 48 h, los sobrenadantes celulares, que contienen las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado, se filtraron, se concentraron (según se describió en el ejemplo 2) y después se emplearon para la transducción.

Se aisló una mezcla de células B CD20+/CD19+ y T CD3+ humanas primarias a partir de una donación de sangre humana. Después, las células se incubaron durante 48 h en RPMI 1640 con NaHCO₃ 2 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%, SP al 0,5%, Hepes 25 mM, así como ligando de CD40 300 ng/ml, IL-2 50 ng/ml, IL-4 10 ng/ml, e IL-10 10 ng/ml. Mediante la incubación con estas citoquinas, las células primarias se activan, lo cual hace que sean susceptibles a la transducción por las partículas de vector lentivírico.

Para la transducción de la mezcla de células humanas primarias se empleó una MOI de 2. Para el prerrevestimiento, la mitad de las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30 o VSV-G concentradas se diluyeron en 120 μ l de medio (medio + citoquinas, véase anteriormente) y se trasladaron a un único pocillo de una placa de 48 pocillos revestida con fibronectina. Esta placa después se centrifugó a 860 g durante 20 min a 4 °C. Mientras, la otra mitad de las partículas de vector se diluyó en 180 μ l de medio (suplementado con 1,2 μ g de sulfato de protamina) que contiene 4 x 10⁴ células humanas primarias y se añade a los pocillos con las respectivas partículas de vector prerrevestidas. Después se realizó una etapa de centrifugación a 860 g durante 1 h a 32 °C. Después de 2 h más de incubación a 37 °C en el incubador se añadieron 700 μ l de medio que incluye las citoquinas indicadas anteriormente por pocillo. Para marcar las células B, las células se tiñeron contra CD20 (anti-CD20 humano de ratón/PE-Cy5; BD Pharmingen™, Heidelberg, Alemania) y CD19 (anti-CD19 humano de ratón/PE; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) 48 h después de la transducción. Para este fin, las células se centrifugaron durante 2 min a 3.000 rpm (Biofuge Fresco Heraeus Instruments) a 4 °C. Los sedimentos después se resuspendieron en 1 ml de tampón de lavado FACS (PBS, FCS al 1%, NaN₃ al 0,1%) y se centrifugaron igual que antes. Después, los sedimentos se incubaron durante 1 h a 4 °C en la oscuridad en una dilución apropiada de anticuerpos anti-CD20 y anti-CD19 directamente acoplados con un fluoróforo apropiado. Después, las células se centrifugaron como se indicó anteriormente, se lavaron dos veces con tampón de lavado FACS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS/paraformaldehído al 1%. Después, se midieron las células GFP-positivas mediante FACS (sistema de citometría de flujo Dako Galaxy, véase la figura 21).

Las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con VSV-G transdujeron ambas células B CD20+/CD19+ con una eficacia de aproximadamente 20% y la fracción de células CD20-/CD19-, que consistía principalmente en células T, con una eficacia de aproximadamente 30% (véase la figura 21a). Así, las partículas de vector pseudotipificado con VSV-G no discriminan entre las dos fracciones celulares. Por contraste, las partículas de vector de VIH-1 pseudotipificado con HmutscFvCD20 Δ 18/Fc Δ 30 transducen las células B CD20-positivas con una eficacia de aproximadamente 40%, mientras que la fracción de células CD20-/CD19- permanece sin transducir (véase la figura 21b). Esto demuestra un transporte dirigido eficaz a células humanas primarias por el sistema de vector de la invención.

Ejemplo 16: Producción de partículas de vector de SIVmac pseudotipificado

Este ejemplo demuestra que los mismos variantes de las proteínas F y H de MeV utilizados para la pseudotipificación de las partículas de vector de VIH-1 también pueden utilizarse para pseudotipificar otros vectores lentivíricos.

Las partículas de vector de SIVmac pseudotipificado se produjeron mediante la cotransfección de células HEK-293T con un plásmido encapsulante, un vector de transferencia, y los dos plásmidos que codifican los variantes de las proteínas H y F, respectivamente. El plásmido encapsulante SIV10+, que codifica los genes *gag* y *pol* de SIVmac, se muestra en la figura 22 (Negre *et al.*, 2000, Gene Ther., 7, pp. 1613-1623), mientras que un ejemplo del plásmido de transferencia GAE-sffv-gfp-wpre (que codifica GFP) se muestra en la figura 23 (Negre *et al.*, 2000, Gene Ther., 7, pp. 1613-1623), aunque pueden utilizarse otros plásmidos.

Las partículas de vector de SIVmac pseudotipificado se generan básicamente como se describió en el ejemplo 2. Brevemente, células HEK-293T se cotransfectaron con 6,72 μ g de plásmido encapsulante que codifica *gag/pol* de SIVmac, 11,27 μ g de plásmido de transferencia que codifica GFP, 1, μ g de plásmido que codifica la proteína H de MeV modificada, y 7 μ g de plásmido que codifica la proteína F de MeV modificada. Esto se realizó mediante una transfección con fosfato de calcio, según se describe en el ejemplo 2. Aproximadamente 48 h después de la transfección, los sobrenadantes celulares, que contienen las partículas de vector de SIVmac pseudotipificado con la proteína Hc Δ 18/Fc Δ 30 y la proteína Hc Δ 19/Fc Δ 30, se filtraron, se concentraron (según se describió en el ejemplo 2) y se emplearon para la transducción de células HT1080.

Para la titulación de las disoluciones madre de partículas de vector concentradas, se sembraron 1,0 x 10⁵ células HT1080 (en DMEM con glucosa 4,5 g/l, NaHCO₃ 3,7 g/l, FCS al 10%, glutamina al 1%) en un único pocillo de una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las disoluciones madre de vector se diluyeron en serie en etapas de 1:10 y después se añadió un total de 250 μ l de las diluciones, que incluyen 2,0 μ g de polibreno, a cada pocillo, se incubó durante 2,5-3 h y se sustituyó por 1 ml de medio fresco. Después de 48-72 h se calcularon las titulaciones determinando el número de células fluorescentes verdes por pocillo realizando el recuento en un microscopio de fluorescencia. Para el recuento se selecciona una dilución en la que significativamente menos que cada célula ha sido transducida. Para calcular el número de partículas de vector transductoras por ml, las células contadas por pocillo se multiplicaron por el factor de dilución y el factor 4 (empleando 250 μ l x 4 = 1 ml).

En la figura 24 se muestran fotografías de las células HT1080 transducidas. Las partículas pseudotipificadas con HcΔ18/FcΔ30 tienen una titulación de $1,7 \times 10^6$ t.u./ml, y las partículas pseudotipificadas con HcΔ19/FcΔ30 tienen una titulación de $3,3 \times 10^5$ t.u./ml en células HT1080.

- 5 Los resultados de este experimento demuestran que las partículas de SIVmac puede ser pseudotipificadas con eficacia con las glicoproteínas de MeV modificadas.

Referencias citadas

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990).
- Cattaneo y Rose, 1993, J. Virol., 67, 1493-1502.
- Cathomen T., *et al.*, Virology, 214:628-632 (1995).
- 10 Engelstaedter *et al.*, 2000, Human Gene Therapy, 11, 293.
- Griffiths *et al.*, 1994; EMBO J., 13, 3245-3260.
- Jespersen *et al.* 2000, Eur. J. Biochem., 267 (5), pp. 1382-1389.
- Junker *et al.*, 2003, Gene Therapy, 10, pp. 1189-1197.
- 15 Laemmli U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," Nature, 227:680-685 (1970).
- Masse *et al.* (2002), J. Virol., 76 (24), pp. 13034-13038.
- Masse *et al.* (2004), J. Virol., 78 (17), pp. 9051-9063.
- Moll *et al.*, 2002, J. Virol., 76 (14), pp. 7174-7186.
- Nakamura *et al.* (2004), Nat. Biotech., 22 (3), pp. 331-336.
- 20 Nakamura *et al.* (2005), Nat. Biotech., 23 (2), pp. 209-214.
- Negre *et al.*, 2000, Gene Ther., 7, pp. 1613-1623.
- Patterson *et al.* (1999), Virology, 256, pp. 142-151.
- Pearson W.R. y Lipman D.J., "Improved tools for biological sequence comparison", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448 (1988).
- 25 Plemper R.K., Hammond A.L., Cattaneo R., "Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum", J. Biol. Chem., 2001, 276(47):44239-44246.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., y Erlich H.A., Science, 239:487 (1988).
- 30 Sambrook J., Fritsch E.F., y Maniatis T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1989).
- Takeda *et al.*, 2000, J. Virol., 74 (14), pp. 6643-6647.
- Toennes *et al.*, J. Neurochem., 73, 2195 (1999).
- Vongpunsawad *et al.* (2004), J. Virol., 78 (1), pp. 302-313.
- Xu K., Ma H., McCown T.J., Verma I.M., Kafri T., Mol. Ther., 3:97-104 (2001).
- 35 Yanagi *et al.* (2006), Jpn. J. Infect. Dis., 59 (1), pp. 1-5.
- Zoller M.J., y Smith M., Nucleic Acids Res., 10:6487-6500 (1982).
- Zoller M.J., Methods Enzymol., 100:468-500 (1983).
- Zoller M.J., DNA, 3(6):479-488 (1984).

REIVINDICACIONES

- 1.- Una partícula de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una proteína de fusión (F) y de hemaglutinina (H) de un morbillivirus, en la que las porciones citoplásmicas de dichas proteínas F y H están truncadas por la delección de restos aminoácidos de dichas porciones citoplásmicas, y
- 5 en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos 1 resto aminoácido de carga positiva y no más de 9 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo N-terminal de la porción citoplásmica de la proteína F,
- y la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir una pseudotipificación eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión,
- 10 en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína H comprende al menos 9 y no más de 19 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo C-terminal de la porción citoplásmica de la proteína H más una metionina adicional en el N-terminal.
- 2.- La partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la reivindicación 1, en la que el morbillivirus es un virus del sarampión, o la cepa Edmonston del virus del sarampión, o
- 15 en la que la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos 3 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo N-terminal de la porción citoplásmica de la proteína F, y la porción citoplásmica truncada de la proteína H comprende al menos 13 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo C-terminal de la porción citoplásmica de la proteína H más una metionina adicional en el N-terminal,
- 20 en la que de uno a cuatro de los restos aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 restos aminoácidos consecutivos, según se cuenta desde el extremo C-terminal de la porción citoplásmica de la proteína H, pueden estar reemplazados por restos alanina,
- o en la que la partícula lentivírica pseudotipificada se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV, o
- 25 en la que la proteína F truncada es Fc Δ 24 o Fc Δ 30 y/o la proteína H truncada se selecciona del grupo que consiste en Hc Δ 14, Hc Δ 15, Hc Δ 16, Hc Δ 17, Hc Δ 18, Hc Δ 19, Hc Δ 120, Hc Δ 21+A y Hc Δ 24+4A.
- 3.- La partícula de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
- en la que dicha partícula de vector es capaz de transducir células que expresan al menos uno de CD46 o SLAM, o que es capaz de transducir selectivamente células que expresan SLAM, en la que opcionalmente dicha partícula de vector es capaz de transducir células seleccionadas del grupo que consiste en células HT1080, HEK-293T, U-87MG, A301 y A-431.
- 30
- 4.- La partícula de vector lentivírico pseudotipificado según las reivindicaciones 1-2, en la que la proteína H truncada es una proteína quimérica que no interacciona con CD46 o SLAM, y que también tiene un anticuerpo monocatenario, un factor del crecimiento o un ligando con un marcador de la superficie celular en su ectodominio,
- en la que opcionalmente el anticuerpo monocatenario o el ligando se dirige contra o se une a un marcador de un cúmulo de diferenciación (CD), un antígeno tumoral expuesto sobre la superficie celular, un receptor de tirosina quinasa, un receptor de un factor del crecimiento, un receptor de quimioquina, un receptor acoplado a proteína G, un receptor olfativo, una proteína vírica expuesta sobre la superficie de células crónicamente infectadas, un receptor de neurotransmisores, un receptor del factor de células pluripotenciales, y un receptor del factor del crecimiento nervioso,
- 35
- en la que opcionalmente el anticuerpo monocatenario o el ligando se dirige contra o se une a una molécula seleccionada del grupo que consiste en CD4, CD8, CD34, CD20, CD19, CD33, CD133, EGF-R y VEGFR-2, mucina-1, el receptor de dopamina, el receptor de acetilcolina, el receptor GABA, EGF-R, VEGFR-2, la proteína gp120 de VIH, (HGF), un receptor del factor del crecimiento epidérmico, un receptor del factor del crecimiento endotelial vascular, un receptor del factor del crecimiento de hepatocitos, un receptor de interleuquinas y/o un receptor de citoquinas y un receptor de eritropoyetina,
- 40
- 45 en la que opcionalmente la proteína H truncada se define mediante la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.
- 5.- La partícula de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
- en la que la cantidad de proteína F truncada presente en dicha partícula de vector es mayor que la cantidad de proteína H truncada presente en dicha partícula de vector,
- 50 en la que opcionalmente la cantidad de proteína F truncada es 10-100% mayor, es 100-250% mayor, es 250-500%

mayor, es 500-750% mayor, es 750-1000% mayor, es más del 1000% mayor, y preferiblemente es 700% mayor que la cantidad de la proteína H truncada.

6.- La partícula de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un vector de expresión de ARN psi-positivo,

5 en la que opcionalmente el vector de expresión de ARN psi-positivo comprende al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que codifica un gen de resistencia a antibióticos, un gen que codifica ARNsi, un gen que codifica ARNsh, un gen que codifica un factor angiogénico, un gen que codifica un factor apoptótico, un gen que codifica un factor citotóxico, un gen que codifica un factor antiapoptótico, un gen que codifica un factor neuroprotector, un gen que codifica un antígeno vírico o bacteriano, un gen que codifica una proteína antivírica, un gen que codifica un antígeno tumoral, un gen que codifica un factor inmunoestimulador, y una copia funcional de un gen defectuoso o mutado en un paciente que padece una enfermedad heredada,

10 en la que opcionalmente el gen se selecciona del grupo que consiste en un gen que codifica GFP, un gen que codifica eGFP, un gen que codifica una proteína inductora de la apoptosis, un gen que codifica una proteína citotóxica, un gen TNF- α , un gen p53, un ARN de interferencia, un gen de interferón, el gen de timidina quinasa del herpes virus, y un gen que codifica una proteína inmunoestimuladora.

7.- Una composición farmacéutica que comprende la partícula de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que opcionalmente comprende también un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 8.- El uso de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento.

25 9.- El uso de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de al menos un trastorno en un sujeto, en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en una infección crónica, la inmunodeficiencia SCID-X1, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurodegenerativa, cáncer, VIH, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes, una enfermedad neuroinflamatoria, una enfermedad reumática, una enfermedad autoinmunitológica, adipositis, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide, y carcinoma renal.

30 10.- El uso de las partículas de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la identificación de tipos celulares definidos, en el que opcionalmente la identificación se realiza en poblaciones de células vivas o en cultivos de órganos para condiciones in vivo.

11.- Una molécula de ácido nucleico, en la que la molécula de ácido nucleico se define mediante la secuencia de ácido nucleico indicada en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, en la que opcionalmente dicha molécula de ácido nucleico es parte de un plásmido o de un plásmido de expresión.

12.- Un método para producir una partícula de vector lentivírico pseudotipificado, que comprende:

35 cotransfectar una línea celular encapsulante con un gen *gag/pol* lentivírico psi-negativo, un vector de expresión lentivírico psi-positivo, y uno o dos vectores de expresión psi-negativos que codifican las proteínas H y F de morbillivirus truncadas de la reivindicación 1,

40 en el que opcionalmente la línea celular encapsulante expresa de forma estable uno o más de los genes codificados por el gen *gag/pol* lentivírico psi-negativo, el vector de expresión lentivírico psi-positivo, o uno o dos vectores de expresión psi-negativos que codifican las proteínas H y F truncadas del virus del sarampión.

13.- Un método para seleccionar anticuerpos en un sistema de mamífero, que comprende:

45 (a) proporcionar un banco de partículas de vector lentivírico pseudotipificado que comprende una pluralidad de diferentes partículas de vector lentivírico pseudotipificado según la reivindicación 4, en el que las proteínas H truncadas de las partículas lentivíricas pseudotipificadas tienen un anticuerpo monocatenario diferente en su ectodominio, y las partículas comprenden también un vector de expresión lentivírico bicistrónico, en el que dicho vector de expresión codifica el anticuerpo monocatenario de la respectiva partícula lentivírica pseudotipificada y un gen indicador expresable;

(b) poner en contacto una población de células que expresan un marcador celular con el banco de la etapa (a), bajo condiciones que permiten la transducción de las células por dichas partículas de vector;

50 (c) seleccionar las células que expresan el gen indicador expresable transducido por una partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a); y

(d) determinar la información genética del anticuerpo monocatenario de la partícula de vector lentivírico pseudotipificado que transduce la célula a partir de las células seleccionadas de la etapa (c).

- 14.- Un método para la detección o la selección de células que expresan un marcador celular específico, comprendiendo dicho método:
- 5 (a) proporcionar una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la reivindicación 4, en el que la proteína H truncada de dicha partícula de vector tiene un anticuerpo monocatenario o un ligando con dicho marcador celular específico en su ectodominio, y dicha partícula de vector comprende también un vector de expresión, en el que dicho vector de expresión codifica un gen indicador expresable;
- (b) poner en contacto la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a) con al menos una célula bajo condiciones que permiten la transducción de dicha al menos una célula por dicha partícula de vector; y
- (c) detectar o seleccionar la célula o células que expresan el gen indicador expresable.
- 10 15.- Un método para identificar el antígeno de un anticuerpo o el receptor de un ligando, comprendiendo dicho método:
- (a) proporcionar una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según la reivindicación 4, en el que la proteína H truncada de dicha partícula de vector tiene un anticuerpo monocatenario o un ligando conocido en su ectodominio dirigido contra o que se une a un antígeno o a un receptor sobre una célula, y dicha partícula de vector comprende
- 15 también un vector de expresión, en el que dicho vector de expresión codifica un gen indicador expresable;
- (b) transducir células con un banco de expresión de la célula de la etapa (a);
- (c) poner en contacto la partícula de vector lentivírico pseudotipificado de la etapa (a) con las células transducidas de la etapa (b);
- (d) seleccionar las células que expresan el gen indicador expresable; y
- 20 (e) determinar la información genética del antígeno o del receptor a partir de las células seleccionadas de la etapa (d).
- 16.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que el gen indicador expresable es un gen que codifica un producto génico seleccionado del grupo de un gen de un marcador seleccionable, un gen que codifica una proteína fluorescente, un gen que confiere resistencia a antibióticos, neomicina, eGFP y GFP, o
- 25 en el que la población de células expresa en la naturaleza el marcador celular, el antígeno o el receptor, o en el que la población de células ha sido transfectada de modo transitorio o estable para que exprese dicho marcador celular, antígeno o receptor, o
- en el que el marcador celular, el antígeno o el receptor se selecciona del grupo que consiste en CD4, CD8, CD34, CD20, CD19, CD33, CD133, EGF-R y VEGFR-2, mucina-1, el receptor de dopamina, el receptor de acetilcolina, el
- 30 receptor GABA, EGF-R, VEGFR-2, la proteína gp120 de VIH, (HGF) y eritropoyetina.

Fig. 1A

**ATGTCACCACAACGAGACCCGATAAATGCCTTCTACAAAGATAACCCCATCCCAAGGGAAGTAGGATAGTCATTAA
 CAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGTGTCATGTTTCTGAGCTTGATCGGGT
 TGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATAAAAGCCTCAGCACC
 CTAGATGTAACCTAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCCTCTCAAATCATCGGTGATGAAGT
 GGGCCTGAGGACACCTCAGAGATTCACCTGACCTAGTGAATTCATCTCTGACAAGATTAAATTCCTTAATCCGGATA
 GGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGATCAACCCGCCAGAGAGAATCAAATGGATTATGATCAATACTGT
 GCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACCACTCTACTGGAGACCAGAACAACCAATCAGTT
 CCTAGCTGTCTCAAAGGGAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATCTCAAACATGCTGCTGTCCCTGT
 TAGACTTGATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATCCCAGGGAATGTATGGGGGAAC
 TACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAGGTGAGAGTTGTCACAACCTGAGCATGTACCGAGTGTGTTGAAGT
 AGGTGTTATCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAAACCTATCTTGAGCAACCAGTCAGTAATG
 ATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTTGTCACGGGGAAGATTCTATCACAAT
 CCCTATCAGGGATCAGGGAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGCTGGAATCCCAACCGACATGCA
 ATCCTGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCACAGAGGTGTTATCGCTG
 ACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGCGAATGGAGACATGCTTCCAACAGGGC
 TGTAAAGGTAATAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAACAGGATTCTTTCATACGG
 GGTCTTGCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAATCAAATTTGCTTCCGGGATTCCGGCCATTGATCACAC
 ACGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACACAACAATGTGTATTGGCTGACTATCCCGCCAAATGAAGAACCTA
 GCCTTAGGTGTAATCAACACATTGGAGTGGATACCGAGATTCAGGTTAGTCCCTACCTTTCACGTCCCAATTA
 GGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGTGATGTCAAACCTCAGTTCCAATC
 TGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTTCCAGGGTTGAACATGCTGTGGTT
 TATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCATATAAAGGGGGTCCCATCGA
 ATTACAAGTGGAAATGCTTACATGGGACCAAAACTCTGGTCCGCTCACTTCTGTGTGCTTGGGACTCAGAATCTG
 GTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCACCCGGGAAGATGGAACCAATCG
 AGA**

Fig. 1B

**MSPQRDRINAFYKDNPHPKGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVL FVMFLSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTAIEIHKSLSTN
 LDVTNSIEHQVKDVLTPLEKII GDEVGLRTPQRFTDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRDLTWCINPPERIKLDYDQYC
 ADVAAEELMNALVNSTLLETRTTNQFLAVSKGNCSGPTTIRGQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIVTMTSQGMYGGT
 YLVEKPNLSSKRSELSQLSMYRVFEVGVIRNPLGAPVHMTNYLEQPVSNLNSCMVALGELKLAALCHGEDSITI
 PYQSGKGVSFQLVKLVWKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSHRGVIADNQAKWAVPTTRTDDKLRMETCFQQA
 CKGKIQALCENPEWAPLKDNRIPSYGVLSVDLSLTVELKIKIASGFGPLITHSGMDLYKSNHNNVYWLTIIPMKNL
 ALGVINTLEWIPRFKVSPLYLFTVPIKEAGGDCHAPTYLPAEVDGDVKLSSNLVILPGQDLQYVLATYDTSRVEHAVV
 YVYVSPSRFSYFYFPRFLPIKGVPIELQVECFTWDQKLWCRHFCVLADSESGGHI THSGMVGMGVSCTVTREDGTNR
 R**

Fig. 2A

ATGTCATCATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCATATTCATGGCAGTACTGTAACTCTCCAAACACCCACCGG
TCAAATCCATTGGGGCAATCTCTCTAAGATAGGGGTGGTAGGAATAGGAAGTGCAAGCTACAAAGTTATGACTCGTT
CCAGCCATCAATCATTAGTCATAAAATTAATGCCCAATATAACTCTCCTCAATAACTGCACGAGGGTAGAGATTGCA
GAATACAGGAGACTACTGAGAACTGTTTTGGAACCAATTAGAGATGCACCTAATGCAATGACCCAGAATATAAGACC
GGTTCAGAGTGTAGCTTCAAGTAGGAGACACAAGAGATTTGCCGGAGTAGTCCTGGCAGGTGCCGGCCCTAGGCGTTG
CCACAGCTGCTCAGATAACAGCCGGCATTGCACTTCACCAGTCCATGCTGAACTCTCAAGCCATCGACAATCTGAGA
GCGAGCCTGGAACTACTAATCAGGCAATTGAGGCAATCAGACAAGCAGGGCAGGAGATGATATTGGCTGTTTCAGGG
TGTTCAAGACTACATCAATAATGAGCTGATACCGTCTATGAACCAACTATCTTGTGATTTAATCGGCCAGAAGCTCG
GGCTCAAATTGCTCAGATACTATACAGAAATCCTGTCTATTATTTGGCCCCAGCTTACGGGACCCCATATCTGCGGAG
ATATCTATCCAGGCTTTGAGCTATGCGCTTGGAGGAGACATCAATAAGGTGTTAGAAAAGCTCGGATACAGTGGAGG
TGATTTACTGGGCATCTTAGAGAGCAGAGGAATAAAGGCCGGATAACTCACGTCGACACAGAGTCTTACTTCAATG
TCCTCAGTATAGCCTATCCGACGCTGTCCGAGATTAAGGGGGTGATTGTCCACCGGCTAGAGGGGGTCTCGTACAAC
ATAGGCTCTCAAGAGTGGTATACCACTGTGCCCAAGTATGTGCGAACCCCAAGGGTACCTTATCTCGAATTTTGATGA
GTCATCGTGTACTTTTCATGCCAGAGGGAAGTGTGTGCAGCCAAAATGCCTTGTACCCGATGAGTCTCTGCTCCAAG
AATGCTCCGGGGGTCCACTAAGTCTGTGCTCGTACACTCGTATCCGGGTCTTTTGGGAACCGGTTTCATTTTATCA
CAAGGGAACCTAATAGCCAATTGTGCATCAATCCTTTGCAAGTGTACACAACAGGAACGATCATTAATCAAGACC
TGACAAGATCCTAACATACATTGCTGCCGATCACTGCCCGTAGTCGAGGTGAACGGCTGACCATCCAAGTCGGGA
GCAGGAGGTATCCAGACGCTGTGTAATGACAGAAATGACCTCGGTCTCCCATATCATTGGAGAGGTTGGACGTA
GGGACAAATCTGGGGAATGCAATGCTAAGTTGGAGGATGCCAAGGAATTGTTGGAGTCATCGGACCAGATATTGAG
GAGTATGAAAGGTTTATCGAGCACTAGCATAGTCTACATCCTGATGTCAGTGTGCTTGGAGGGTTGATAGGGATCC
CCGCTTTAATATGTTGCTGCAGGGGGCGTTGTAATAAAAAGGGGAGAACAAGTTGGTATGTCAAGACCAGGCCATAAG
CCTGATCTTACGGGAACATCAAATCCTATGTAAGGTGCGCTCTGA

Fig. 2B

MSIMGLKVNVS AIFMAVLLTLQTP TQIHWGNLSKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLPNITLLNNCTRVEIA
EYRRLRLRVLEPIRDALNAMTQNIRPVQSVASSRRHRKRFAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSM LNSQAI DNLR
ASLETTNQAIEAIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPSMNQLSCDLIGQKLGKLLRYYTEILSLFGPSLRDPISAE
ISIQALSALGGDINKVLEKLGYSGGDLLGILESRGIKARITHVDTESYFIVLSIAYPTLSEIKGVIVHRLEGVSYN
IGSQEWYTTVPKYVATQGYLISNFDSSCTFMPEGTVC SQNALYPMSPLLQECLRGSTKSCARTLVSGSFGNRFILS
QGNLIANCASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVVEVNGVTIQVGSRRYPDAVYLHRIDLGPPI SLERLDV
GTNLGNIAKLEDAKELLESDQILRSMKGLSSTSIVYILIAVCLGGLIGIPALICCCRGR CNKKGEQVGM SRPGLK
PDLTGT SKSYVRSL

Fig. 3A

ATGGGAAGTAGGATAGTCATTAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGT
 CATGTTTCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGA
 TCCATAAAGCCTCAGCACCAATCTAGATGTAACCTAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCCTC
 TTCAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCAGTACCTAGTGAATTCATCTCTGACAA
 GATTAAATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAATCA
 AATTGGATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACCTCAACTCTACTG
 GAGACCAGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCACTACAATCAGAGGTCAATT
 CTCAAACATGTCGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACATGACAT
 CCCAGGGAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAGGTCAGAGTTGTCACAACCTG
 AGCATGTACCAGTGTTTGAAGTAGGTGTTATCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAAATA
 TCTTGAGCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTTGTC
 ACGGGGAAGATTCATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTC
 TGGAAATCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGTAGACAGGCTTTACCTCTC
 ATCTCACAGAGGTGTTATCGCTGACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGCGAA
 TGGAGACATGCTCCAACAGGCGTGTAAAGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAG
 GATAACAGGATTCCTTCATACGGGTCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATTTGCTC
 GGGATTCCGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAAATGTGTATTGGCTGA
 CTATCCCGCCAAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCC
 TACCTCTTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGG
 TGATGTCAAACCTCAGTTCCAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTT
 CCAGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTTCTACTTTTATCCTTTTAGGTTG
 CCTATAAAGGGGTCCTTCATCGAATTAACAAGTGAATGCTTCACATGGGACCAAAAACCTCTGGTCCCGTCACTTCTG
 TGTGCTTGGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCA
 CCCGGGAAGATGGAACCAATCGCAGA

Fig. 3B

ATGACTAGGATAGTCATTAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGT
 GTTCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCC
 ATAAAGCCTCAGCACCAATCTAGATGTAACCTAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCCTCTTC
 AAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCAGTACCTAGTGAATTCATCTCTGACAAGAT
 TAAATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAATCAAAT
 TGGATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATGGTGAACCTCAACTCTACTGGAG
 ACCAGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTC
 AAACATGTCGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCTCTATAGTCACTATGACATCCC
 AGGGAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAGGTCAGAGTTGTCACAACCTGAGC
 ATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTATCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAAATATCT
 TGAGCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTTGTCACG
 GGGAAGATTCATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGG
 AAATCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGTAGACAGGCTTTACCTCTCATC
 TCACAGAGGTGTTATCGCTGACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGCGAATGG
 AGACATGCTTCCAACAGGCGTGTAAAGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGAT
 AACAGGATTCCTTCATACGGGTCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATTTGCTTCGGG
 ATTCCGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGACTA
 TCCCGCCAATGAAGAACC TAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCTAC
 CTCTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGA
 TGTCAAACCTCAGTTCCAATCTGGTGTATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTTCCA
 GGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTTCTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCC
 ATAAAGGGGTCCTTCATCGAATTAACAAGTGAATGCTTCACATGGGACCAAAAACCTCTGGTCCCGTCACTTCTGTG
 GCTTGGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACCTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCAACC
 GGAAGATGGAACCAATCGCAGA

Fig. 3C

ATGGCTGCCGACGGAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTGGCTGGCTGTTCTGTTTGTTCATGTT
 TCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATA
 AAAGCCTCAGACCAATCTAGATGTAACCTCAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCACTCTTCAA
 ATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCAGTACCTGACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGATTA
 ATTCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCGCCAGAGAGAATCAAATTGG
 ATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACCTCACTCTACTGGAGACC
 AGAACACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAACTGCTCAGGGCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAA
 CATGTGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATCCAGG
 GAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAGGTGAGAGTGTGCACAACGAGCATG
 TACCGAGTGTGTAAGTAGGTGTTATCAGAAAATCCGGGTTGGGGGCTCCGGTGTTCATATGACAAAATATCTTGA
 GCAACAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTTGTCACGGGG
 AAGATTCATCACAATCCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGCTGGAAA
 TCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCA
 CAGAGGTGTATCGCTGACAACCAAGCAAATGGGCTGTCCCGACAACCGAACAGATGACAAGTTGCGAATGGAGA
 CATGCTTCCAACAGGCGTGAAGGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAAC
 AGGATTCCTTCATACGGGCTCTGTCTGTTGATCTGAGCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATTTGCTTCGGGATT
 CGGGCCATTGATCACACAGGTTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAATGTGATTGGCTGACTATCC
 CGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCTACCTC
 TTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGTATGT
 CAAACTCAGTTCCAATCTGGTGAATCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTGGCAACCTACGATACTTCCAGGG
 TTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATA
 AAGGGGTCCCCATCGAATTACAAGTGAATGCTTACATGCGGACCAAAAACCTCTGGTGGCTCCTCTGTGTGCT
 TGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCACCCGGG
 AAGATGGAACCAATCGCAGA

Fig. 3D

MGSRVINREHLMIDRPYVLLAVLFVMFSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTAIEIHKSLSTNLDVNTSIEHQVKDVLTP
 FKIIGDEVGLRTPQRFDTLVKFI SDKIKFLNPDREYDFRDLTWCINPPERIKLDYDQYCADVAEELMNALVNSTLL
 ETRTTNQLAVSKGNCSGPTTIRGQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIVTMTSQMGYGGTYLVEKPNLSSKRSELSQL
 SMYRVFEVGVIRNPGLGAPVFMNTNYLEQPVSNLNSNCMVALGELKLAALCHGEDSITIPYQSGKGVSFQLVKLV
 WKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSHRGVIADNQAQWAVPTTRTDDKLRMETCFQACKGKIQAALCENPEWAPLK
 DNRIPSYGVLSVDLSLVELKIKIASGFGLITHGSGMDLYKSNHNNVYWLTIIPMKNLALGVINTLEWIPRFKVS
 YLFTVPIKEAGGDCHAPTYPAEVDGDVKLSSNLVILPGQDLQYVLTATYDTSRVEHAVVYVYSPSRFSYFYFPR
 PIKGVPIELQVECFWQKLVCRHFCVLADESSEGGHITHSGMVGMSCTVTREDGTNR

Fig. 3E

ATGTCCATCATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCATATTCATGGCAGTACTGTTAACTCTCCAAACACCCACCGG
 TCAAATCCATTGGGGCAATCTCTCTAAGATAGGGGTGGTAGGAATAGGAAGTGCAAGCTACAAAGTTATGACTCGTT
 CCAGCCATCAATCATTAGTCATAAAATTAATGCCCAATATAACTCTCCTCAATAACTGCACGAGGGTAGAGATTGCA
 GAATACAGGAGACTACTGAGAACTGTTTTGGAACCAATTAGAGATGCACCTAATGCAATGACCCAGAATATAAGACC
 GGTTCAGAGTGTAGCTTCAAGTAGGAGACACAAGAGATTTGCGGGAGTAGTCCTGGCAGGTGCGGCCCTAGGCGTTG
 CCACAGCTGCTCAGATAACAGCCGGCATTGCACTTCACCAGTCCATGCTGAACTCTCAAGCCATCGACAATCTGAGA
 GCGAGCCTGAAACTACTAATCAGGCAATTGAGGCAATCAGACAAGCAGGGCAGGAGATGATATTGGCTGTTGAGGG
 TGTCCAAGACTACATCAATAATGAGCTGATACCGTCTATGAACCAACTATCTTGTGATTTAATCGGCCAGAAGCTCG
 GGCTCAAATGCTCAGATACTATAACAGAAATCCTGTCAATFATTTGGCCCCAGCTTACGGGACCCCATATCTGCGGAG
 ATATCTATCCAGGCTTTGAGCTATGCGCTTGAGGAGACATCAATAAGGTGTTAGAAAAGCTCGGATACAGTGGAGG
 TGATTTACTGGGCATCTTAGAGAGCAGAGGAATAAAGGCCCGGATAACTCACGTGACACAGAGTCCACTTCATTG
 TCCTCAGTATAGCCTATCCGACGCTGTCCGAGATTAAGGGGGTGATTGTCCACCGGCTAGAGGGGGTCTCGTACAAC
 ATAGGCTCTCAAGAGTGGTATACCCTGTGCCCAAGTATGTCGCAACCAAGGGTACCTTATCTCGAATTTTGATGA
 GTCATCGTGTACTTTTCATGCCAGAGGGAACTGTGTGCAGCCAAAATGCCTTGTACCAGGATGAGTCCCTGCTCCAAG
 AATGCCCTCCGGGGTCCACTAAGTCCGTGCTCGTACACTCGTATCCGGGTCTTTTGGGAACCGGTTCAATTTATCA
 CAAGGGAACCTAATAGCCAATTGTGCATCAATCCTTTGCAAGTGTACACAACAGGAACGATCATTAATCAAGACCC
 TGACAAGATCCTAACATACATTGCTGCCGATCACTGCCCGGTAGTCGAGGTGAACGGCGTGACCATCCAAGTCGGGA
 GCAGGAGGTATCCAGACGCTGTGTACTTGCACAGAATTGACCTCGGTCCCTCCCATATCATTGGAGAGGTTGGACGTA
 GGGACAAATCTGGGGAATGCAATTGCTAAGTTGGAGGATGCCAAGGAATGTTGGAGTCATCGGACCAGATATTGAG
 GAGTATGAAAGGTTTTATCGAGCACTAGCATAGTCTACATCCTGATTGCAGTGTGTCTTGGAGGGTTGATAGGGATCC
 CCGCTTTAATATGTTGCTGCAGGGGGCGTTGA

Fig. 3F

MSIMGLKVNVSALFMAVLLTLQTPQGIIHWGNLSKIGVVIGSASYKVMTRSSHQSLVIKLPNITLLNNCTRVEIA
 EYRRLLRVLEPIRDALNAMTQNIQVQSVASSRRHKRFAGVVLAGAALGVATAAQITAGIALHQSMNSQAIDNLR
 ASLETTNQAIEAIRQAGQEMILAVQGVQDYINNELIPSMNQLSCDLIGQKLGKLLRYYTEILSLFGPSLRDPISAE
 ISIQALSIALGGDINKVLEKLGYSGGDLLGILESRIKARITHVDTESYFIVLSIAYPTLSEIKGVIVHRLEGVSYN
 IGSQEWYTTVPKYVATQGYLISNFEDESSCTFMPEGTVCSONALYPMSPLLQECLELRGSKSCARTLVSGSFGNRFILS
 QGNLIANCASILCKCYTTGTIINQDPDKILTYIAADHCPVVEVNGVTIQVGSRRYPDAVYLHRIIDLGPPISLERLDV
 GTNLGNIAIAKLEDAKELLESSDQILRSMRGLSSTSIVYILIAVCLGGLIGIPALICCCGR

Fig. 3G

ATGGCTGCCGCAGCGAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGTTCATGTT
TCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATA
AAAGCCTCAGCACCAATCTAGATGTAACATACTCAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCACTCTTCAAA
ATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCAGTACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGATTAA
ATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAATCAAATTGG
ATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAACCTCAACTCTACTGGAGACC
AGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAAA
CATGTCGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCACTATAGTCACTATGACATCCCAGG
GAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAAGGTCAGAGTTGTCACAACCTGAGCATG
TACCGAGTGTGTAAGTAGGTGTTATCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAAACCTATCTTGA
GCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTTGTCACGGGG
AAGATTCTATCACAATTCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGGAAA
TCCCCAACCGACATGCAATCTGGGTCCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCA
CAGAGGTGTTATCGCTGACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGCGAATGGAGA
CATGCTTCCAACAGGCGTGTAAAGGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAAC
AGGATTCCCTCATAACGGGCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATTTGCTTCGGGATT
CGGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGACTATCC
CGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCTACCTC
TTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACTACCTGCGGAGGTGGATGGTGATGT
CAAACCTCAGTTCCAATCTGGTGATTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTGGCAACCTACGATACTTCCAGGG
TTGAACATGCTGTGGTTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCTATA
AAGGGGTCCCCATCGAATTACAAGTGGAAATGCTTCACATGGGACCAAAAACCTCTGGTGGCGTCACTTCTGTGTGCT
TGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCAACCCGGG
AAGATGGAACCAATCGCAGA

Fig. 4A

	TM	CD
F _{Edm} wt	LICCC	RGRCNKKGEQVGMSRPGLKPDLTGTSKSYVRSL
FcΔ30	LICCC	RGR

Fig. 4B

	CD	TM
H _{Edm} wt	MSPQRDRINAFYKDNPHPKGSRIVINREHLMIDR	PYVL
HcΔ18	M.....GSRIVINREHLMIDR	PYVL
HcΔ19	M.....SRIVINREHLMIDR	PYVL
HcΔ24+4A	M.....AAAANREHLMIDR	PYVL

Fig. 5A

ATGGGAAGTAGGATAGTCATTAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTGT
 CATGTTTCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGA
 TCCATAAAAGCCTCAGCACC AATCTAGATGTAAC TAACTCAATCGAGCATCAGGTCAAGGACGTGCTGACACCACTC
 TTCAAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCACTGACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAA
 GATTAATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAATCA
 AATTGGATTATGATCAACTACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAAGTCAACTCTACTG
 GAGACCAGAACAACCAATCAGTCC'AGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCACTACAATCAGAGGTCAATT
 CTCAAACATGTCGCTGTCCCTGTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACAT
 CCCAGGGAATGTATGGGGGAACCTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAGGTCAGAGTTGTCCAACTG
 AGCATGTACCGAGTGTGTTGAAGTAGGTGTTATCAGAAATCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAACTA
 TCTTGAGCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAACCTCGCAGCCCTTGTG
 ACGGGGAAGATTCTATCACAATTCCTCAGGATCAGGGAAGGTGTCAGTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTC
 TGGAAATCCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTC
 ATCTCACAGAGGTGTTATCGCTGACAACCAAGCAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGCGAA
 TGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGAAGGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAG
 GATAACAGGATTCTTCATACGGGCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATTTGCTTC
 GGGATTCCGGCCATTGATCACACAGGTTTCCAGGATGGACCTATACAAATCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGA
 CTATCCCGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCC
GCACTCTTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGG
 TGATGTCAAACCTCAGTCCCAATCTGGTGAATCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTT
 CCGCGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTATCGTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTG
 CCTATAAAGGGGTTCCCATCGAATTACAAGTGGAAATGCTTCACATGGGACCAAAAACCTCTGGTGCCGTCACCTCTG
 TGTGCTTGGCGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCA
 CCCGGGAAGATGAACCAATGC GGCCAGCCGGCCATCGAGGGAAGGATGGCTCAGGTTCACTGGTCCAGTCAGGG
 GCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCAGTTACAATAT
 GCCTGGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGCCCTGGAATGGATTGGAGCTATTTATCCAGGAAATGGTGATACTTCTT
 ACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGC
 CTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGCGCAATTACGACCTAECTACTGTTACTTCGATCTG
 GGGCGCAGGGACCAGGTCACCGTGAGCAAGATCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGAG
 GCTCGGGTGGCTCGAGCGACATCGTGTCTGCGAGTCTCCAGCAATCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACA
 ATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATGCACCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCTCCCCAAACCCTG
 GATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTC
 TCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAAGTCCAGCAGTGGATTAGTAACCCACCACGTT
 GGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAGGCGGGCCGCAAGAGGTTCTCATCACCATCACCATCACTAA

Fig. 5B

MGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFVFMFLSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTAELHKSLSLNLVDVNSIEHQVKDVLTP
 FKIIIGDEVGLRTPQRFTDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRDLTWCINPPERIKLDYDQYCADVAEEELMNALVNSTLL
 ETRTTNQFLAVSKGNCSGPTTIRGQFSNMSLSLLDLYLGRYVNVSSIVTMTSQMGYGGTYLVEKPNLSSKRSELSQL
 SMYRVFEVGVIRNPLGAPVFMHTNYLEQPVSNLNSNCMVALGELKLAALCHGEDSITIPYQGSKGVSFQLVKLV
 WKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDRLYLSSHVRVIADNQAQWAVPTTRTDDKLRMETCFQQACKGKIQAALCENPEWAPLK
 DNRI PSYGVLSVDLSLTVELKIKIASGFGLITHGSGMDLYKSNHNNVYWLTI PPMKNLALGVINTLEWI PRFKVSP
ALFTVPIKEAGGDCHAPTYLPAEVDGDVKSLSNLVILPGQDLQYVLATYDTSAVEHAVVYVYVSPSRLSSYFPPRL
 PIKGVPIELQVECFWDQKLWCRHFCVLADSESGHITHSGMVMGVSCVTREDGTNAAQPAIEGRMAQVQLVQSG
 AELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS
 LTSEDSAVYYCARAQLRPNYWFYFDVWGAGTTVTVSKI SGGGSGGGGSGGGGSGGSSDIVLSQSPA ILSASPEKVT
 MTCRASSSVSYMHYVYQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTF
 GAGTKLELKAARGSHHHHHH

Fig. 5C

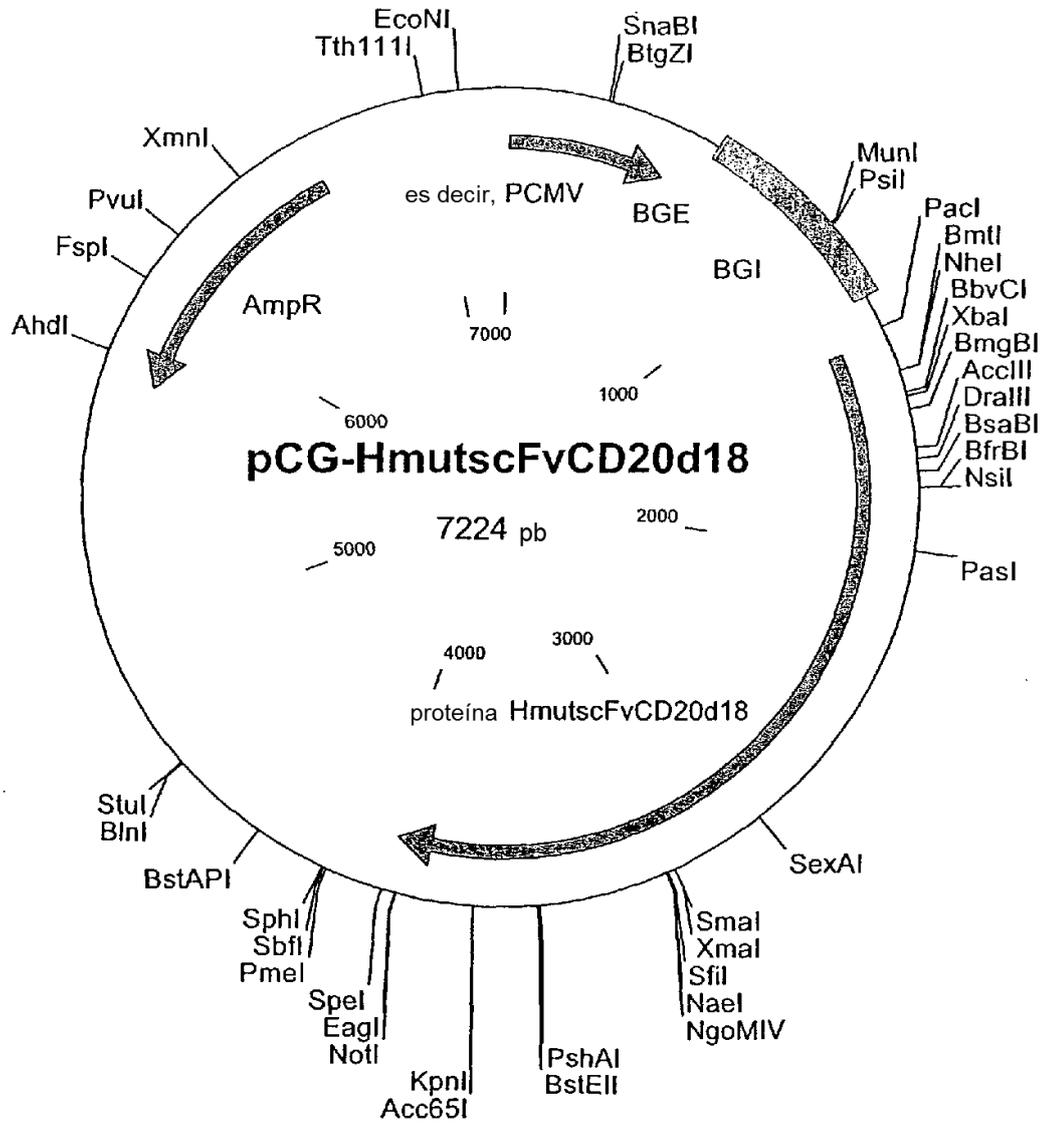


Fig. 6A

GGCCCAGCCGGCCATGGCCAATAGTGACTCTGAATGTCCCCTGTCCCACGATGGGTACTGCCTCCATGATGGTGTGT
GCATGTATATTGAAGCATTGGACAAGTATGCATGCAACTGTGTTGTTGGCTACATCGGGGAGCGATGTCAGTACCGA
GACCTGAAGTGGTGGGAACTGCGCGCGGCCGC

Fig. 6B

AQPAMANS DSECP LSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELRAAA

Fig. 7A

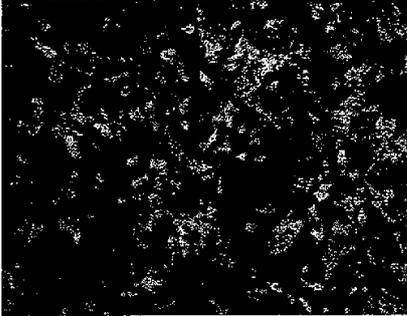


Fig. 7B



Fig. 7C

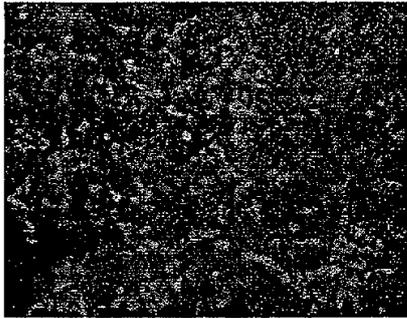


Fig. 7D



Fig. 8A

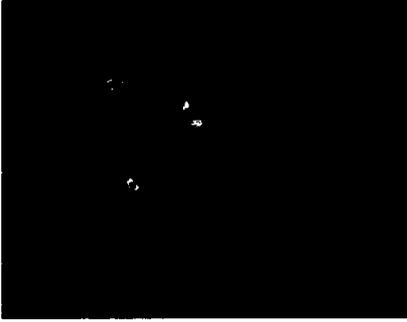


Fig. 8B

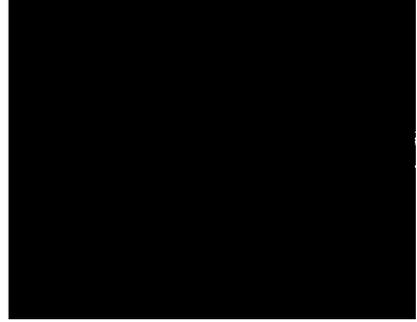


Fig. 8C



Fig. 8D



Fig. 8E

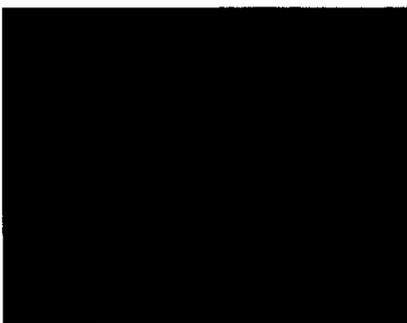


Fig. 8F



Fig. 9

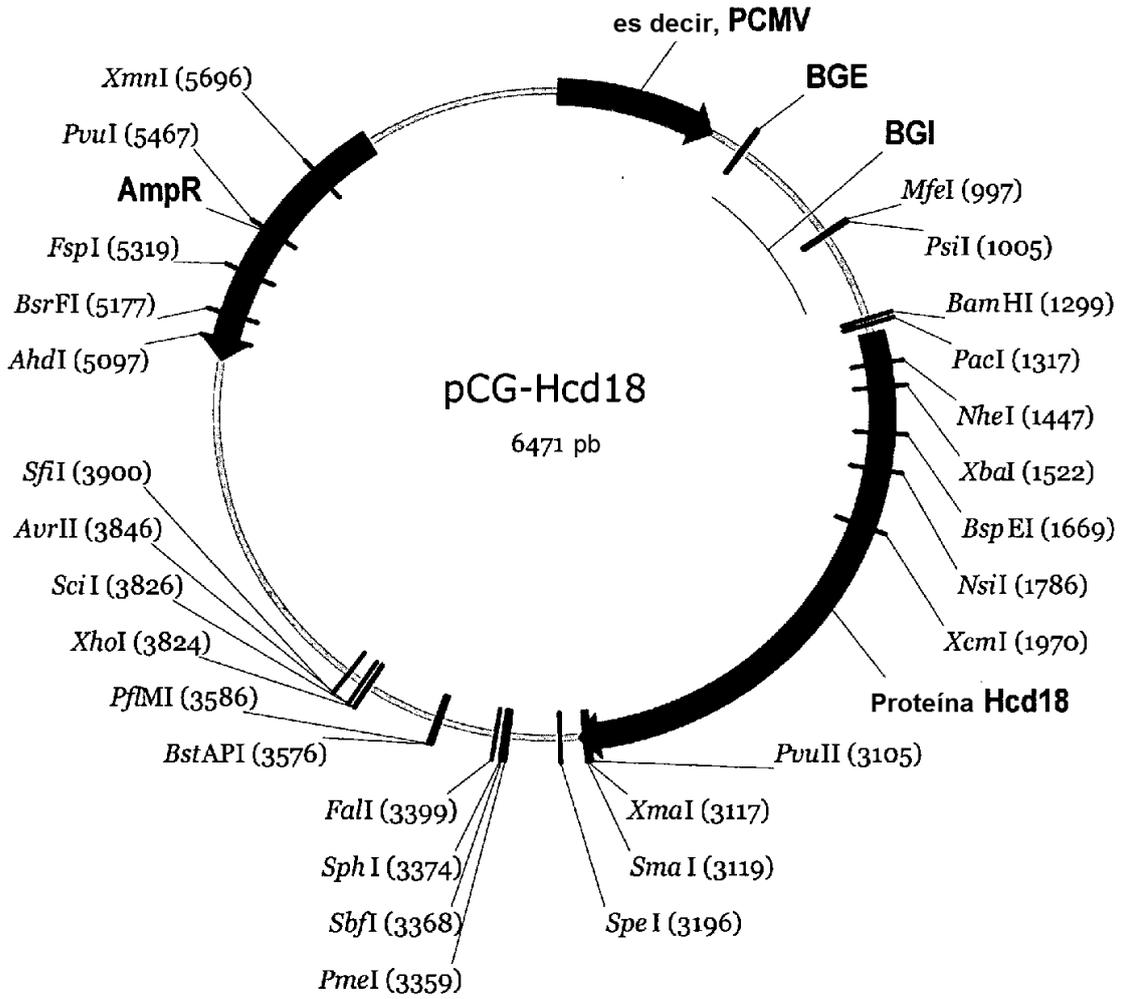


Fig. 10

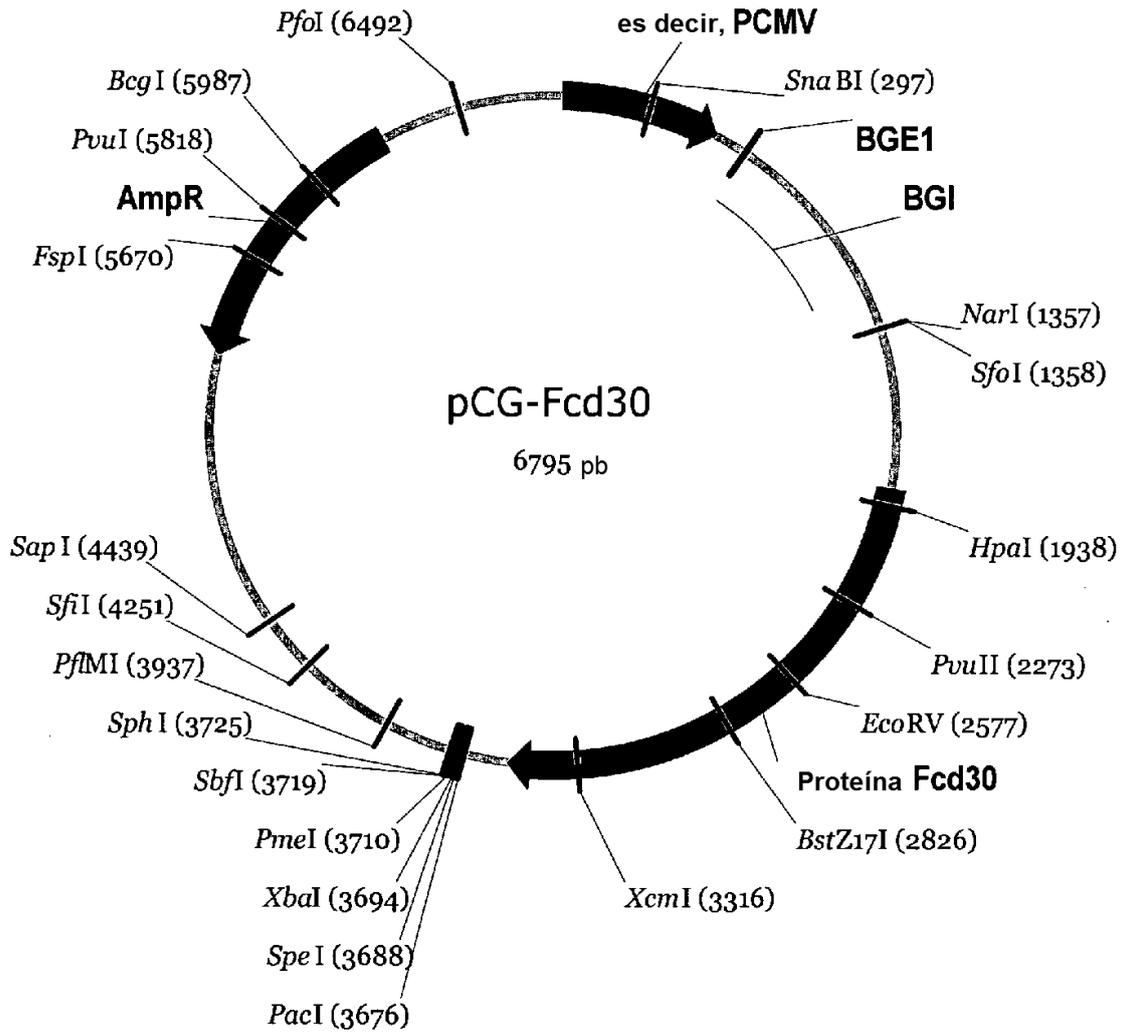


Fig. 11

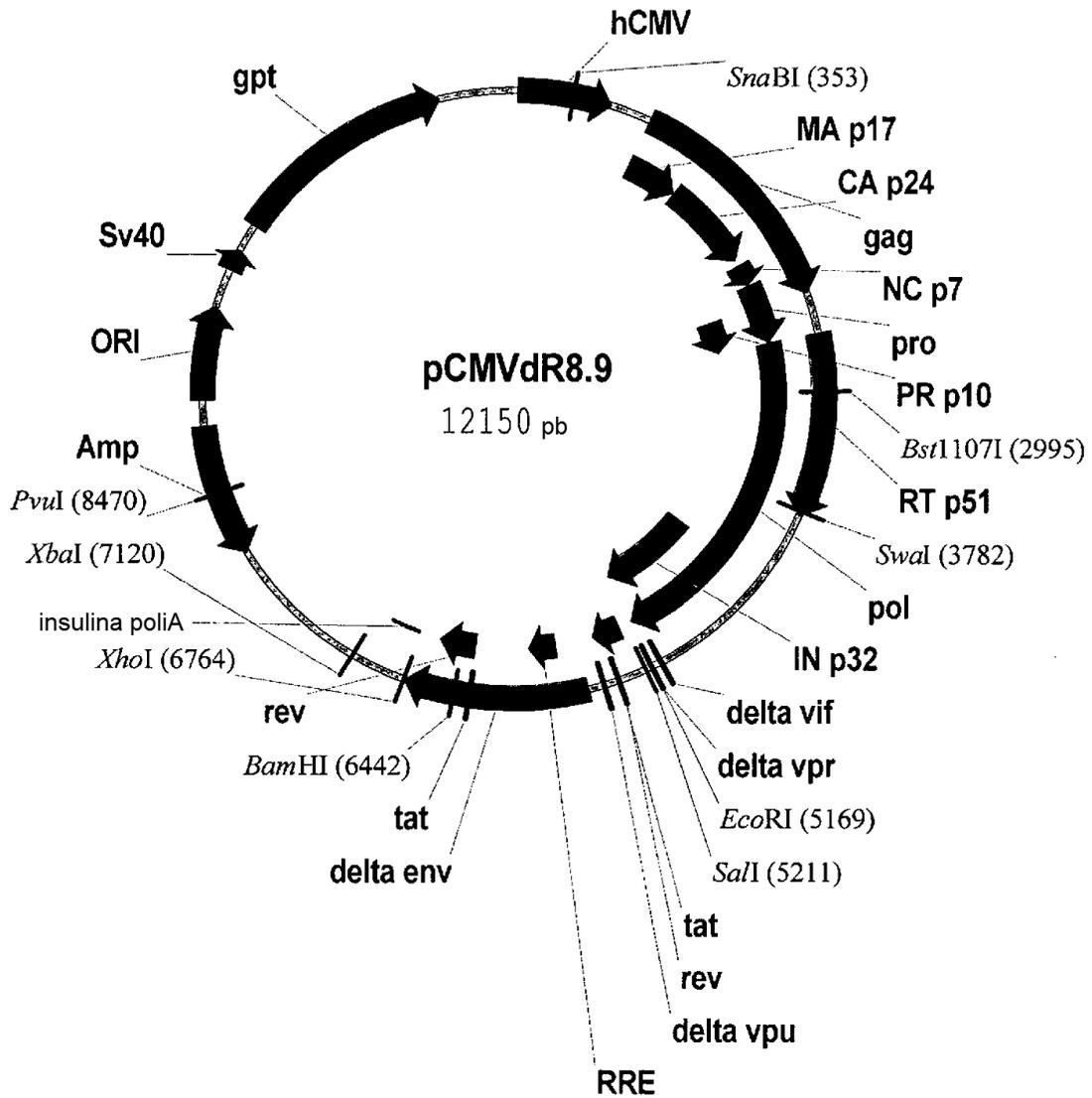


Fig. 12

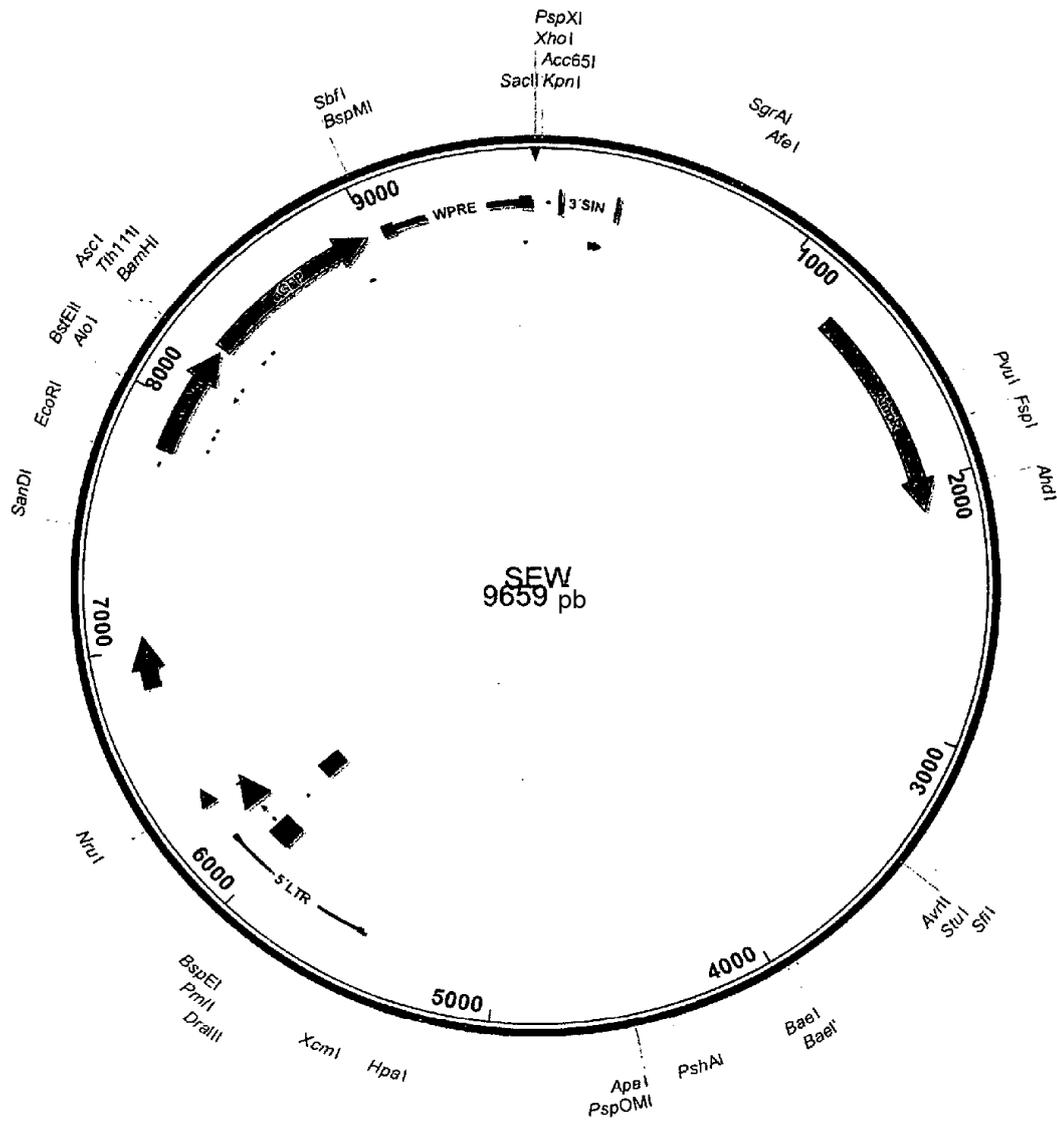


Fig. 13

a

Variantes de F/H de los vectores de VIH-1	Reducción de la titulación relativa con AZT
Fc Δ 30 Hc Δ 18	aprox. 97%
Fc Δ 30 Hc Δ 19	aprox. 90%
Fc Δ 30 Hc Δ 24+4A	aprox. 90%
Control pos.: VSV-G	aprox. 99%

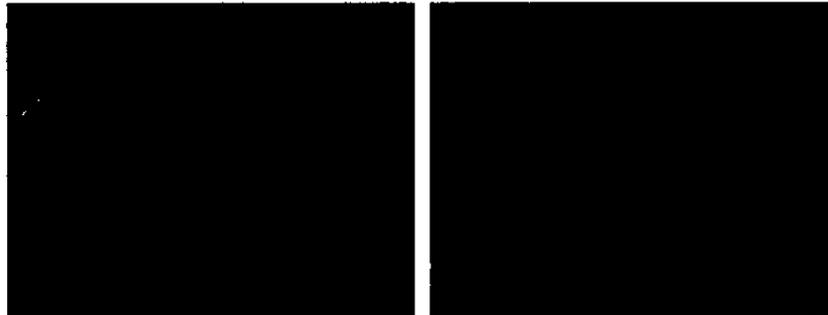
b**sin AZT****con AZT**

Fig. 14

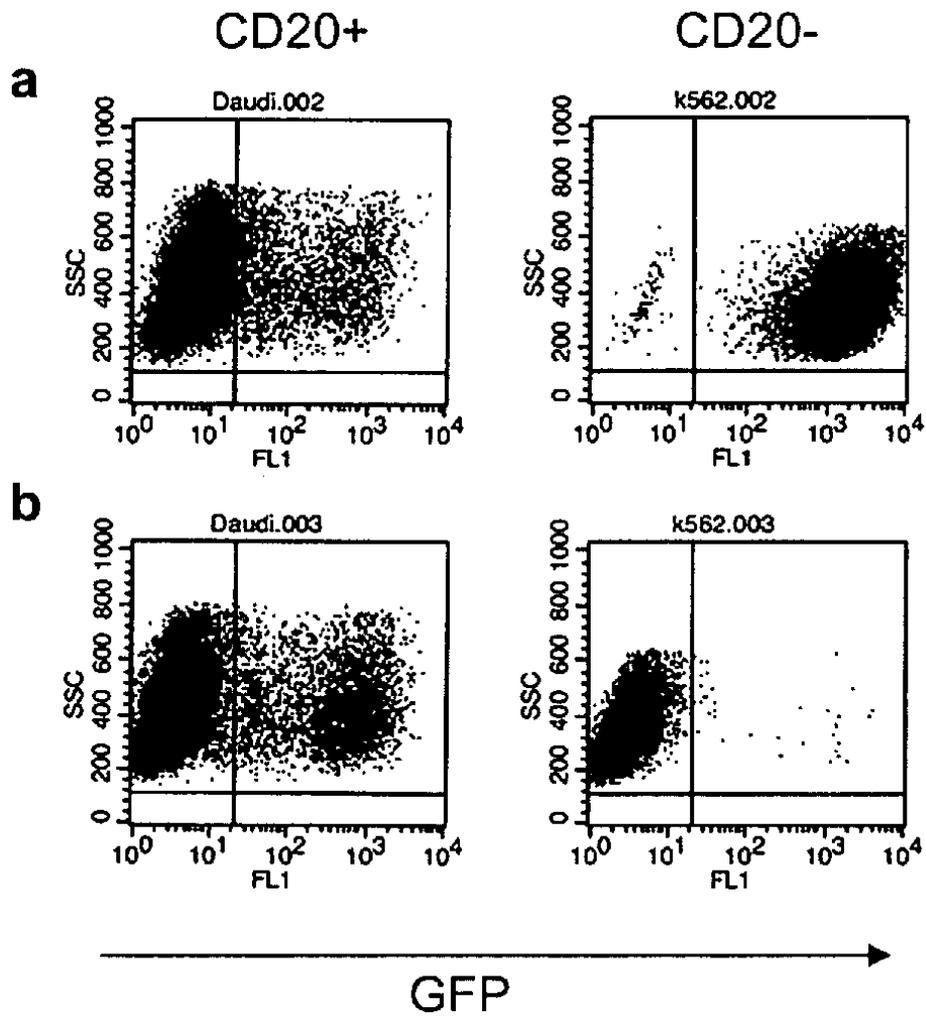


Fig. 15

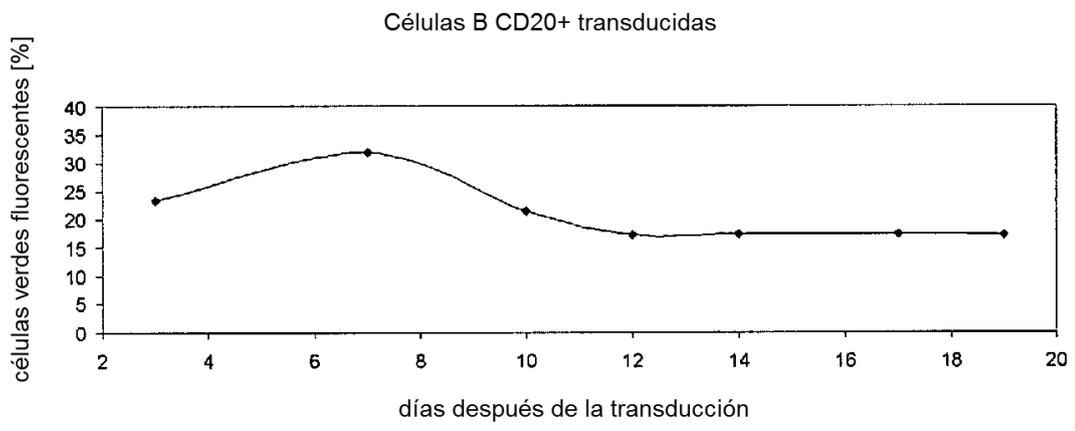


Fig. 16

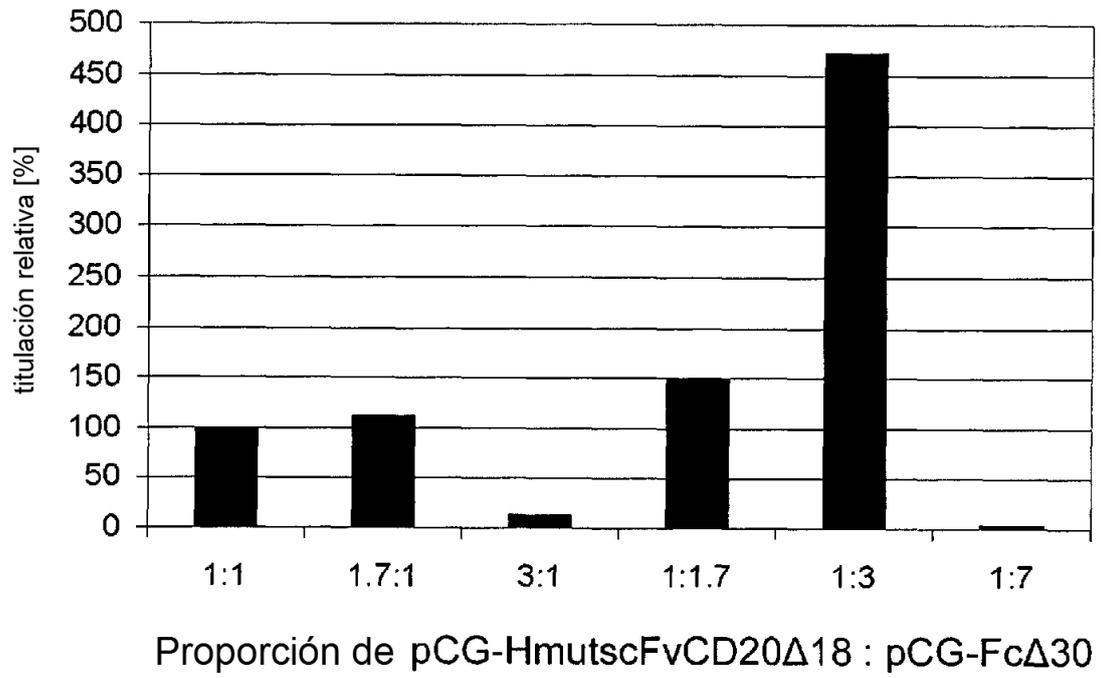
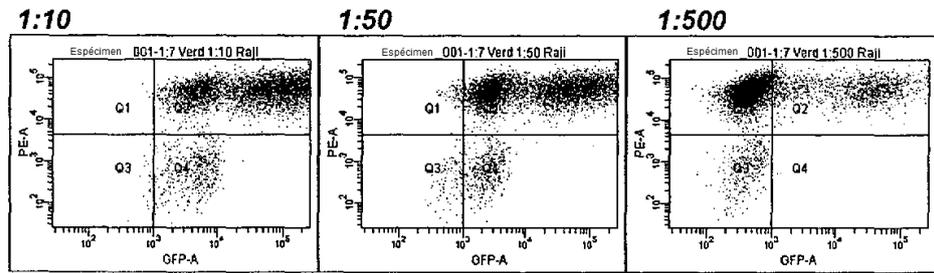


Fig. 17

A Raji



B HT1080

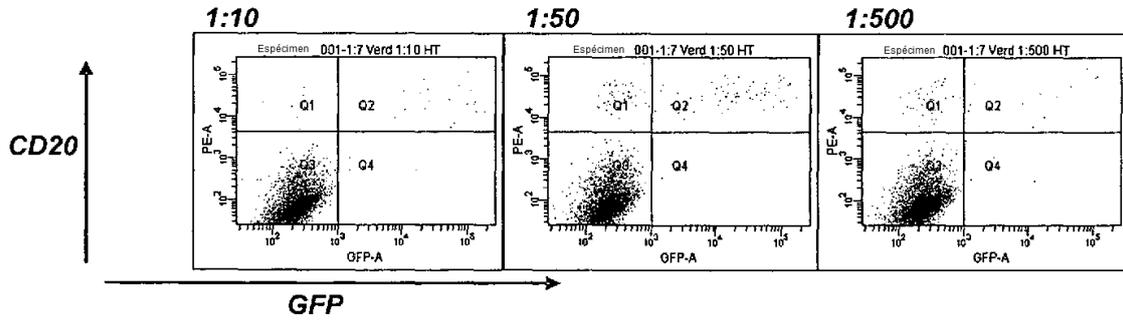


Fig. 18

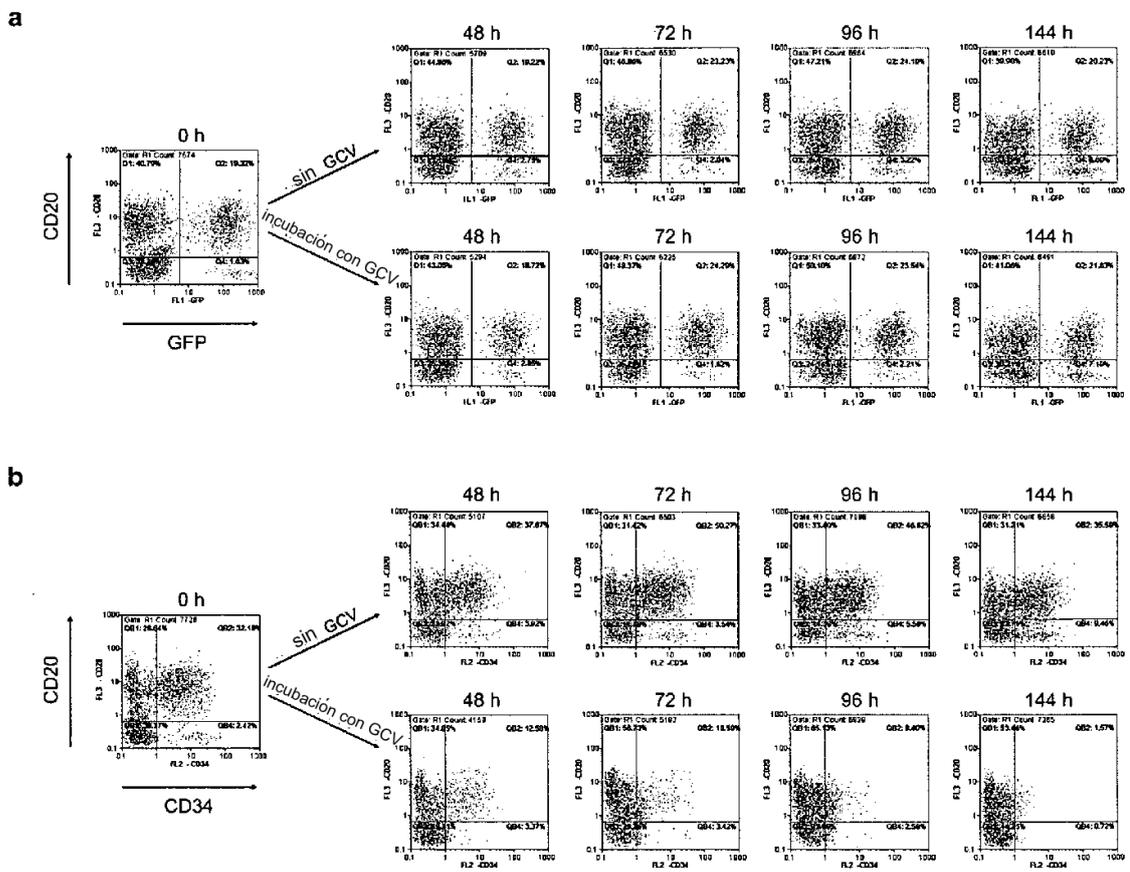


Fig. 19

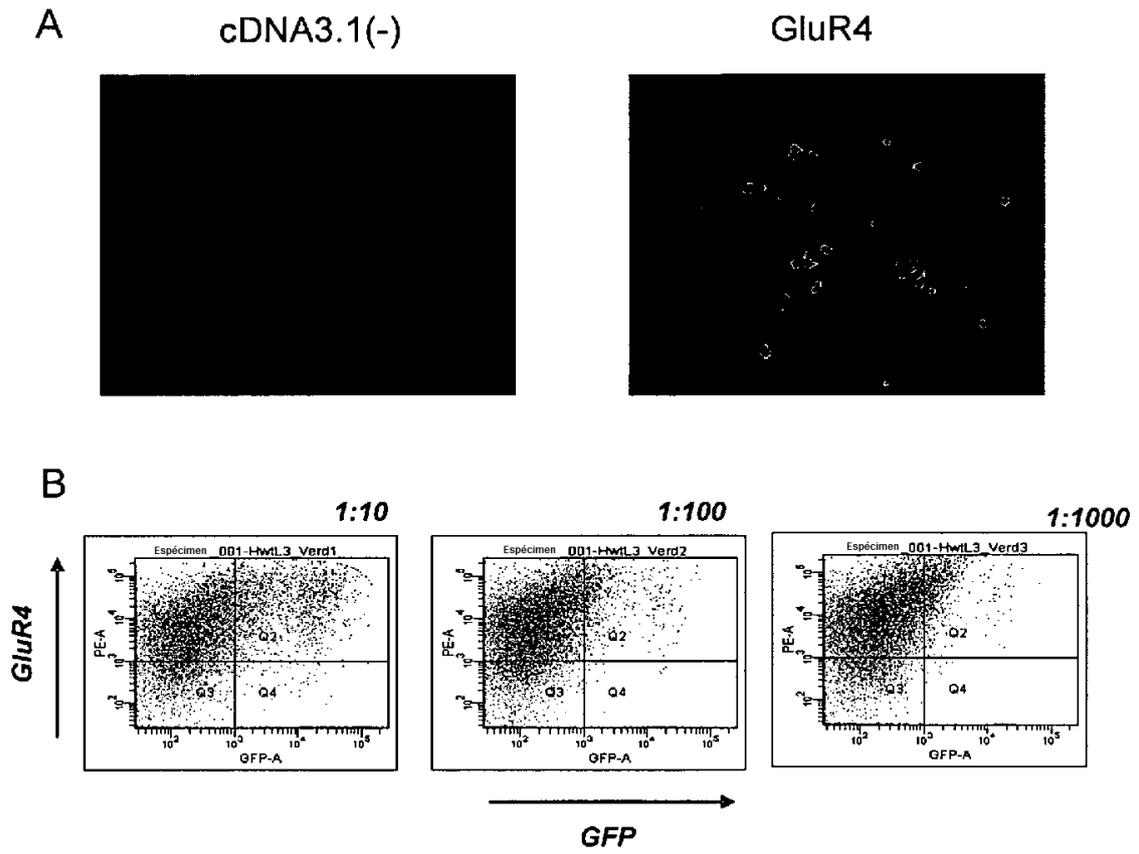


Fig. 20

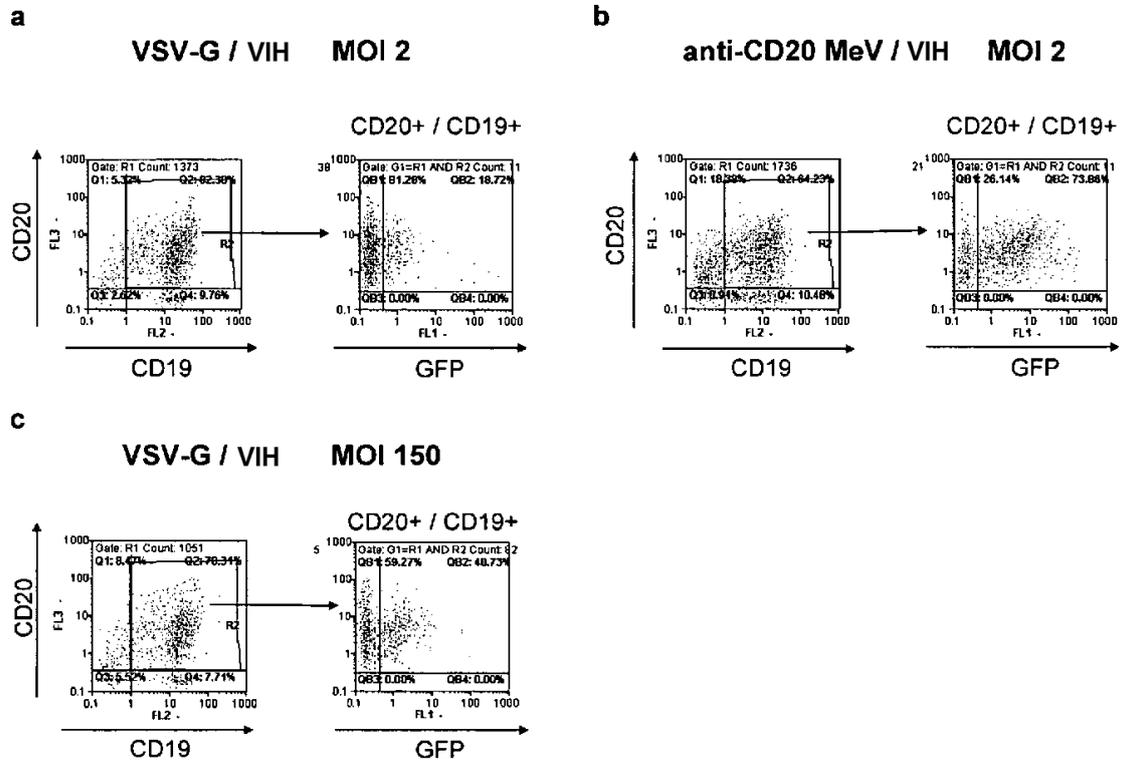


Fig. 21

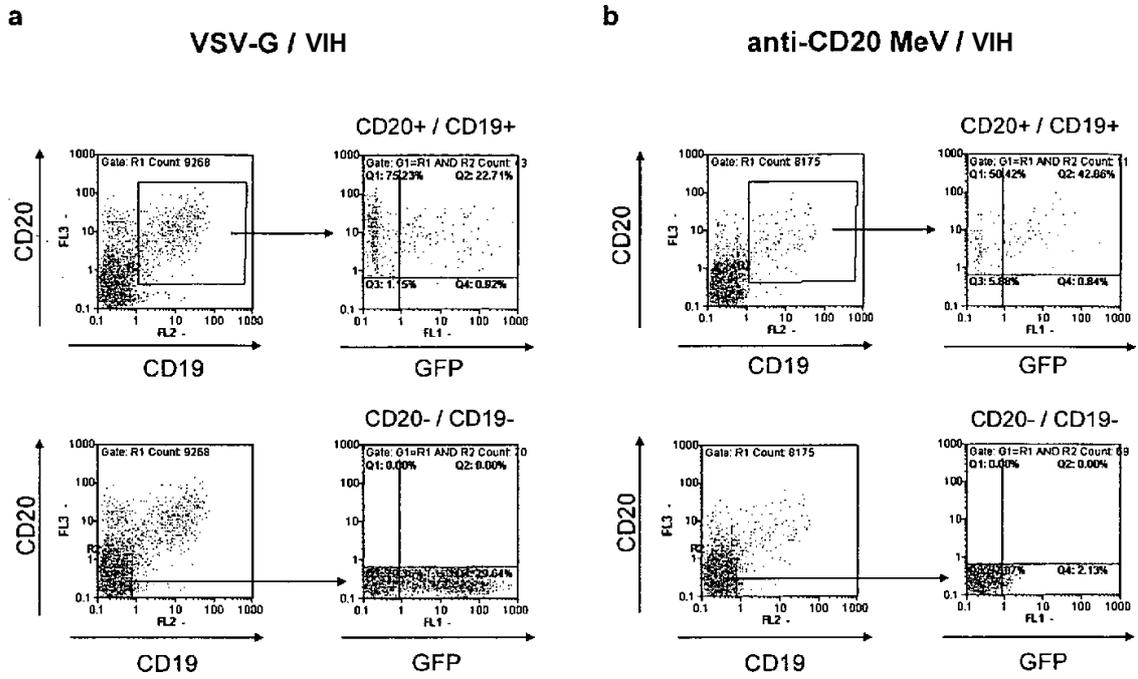


Fig. 22

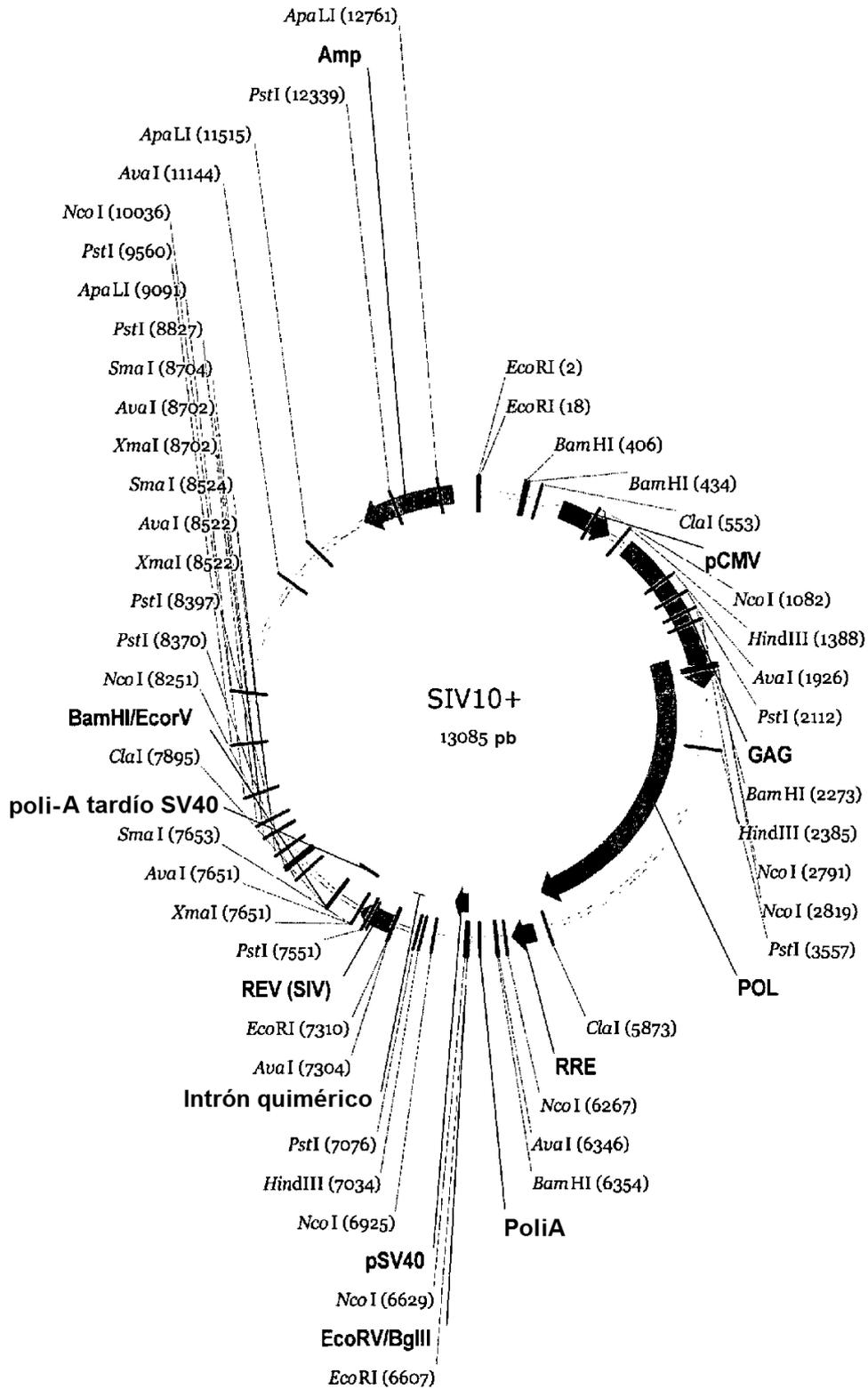


Fig. 23

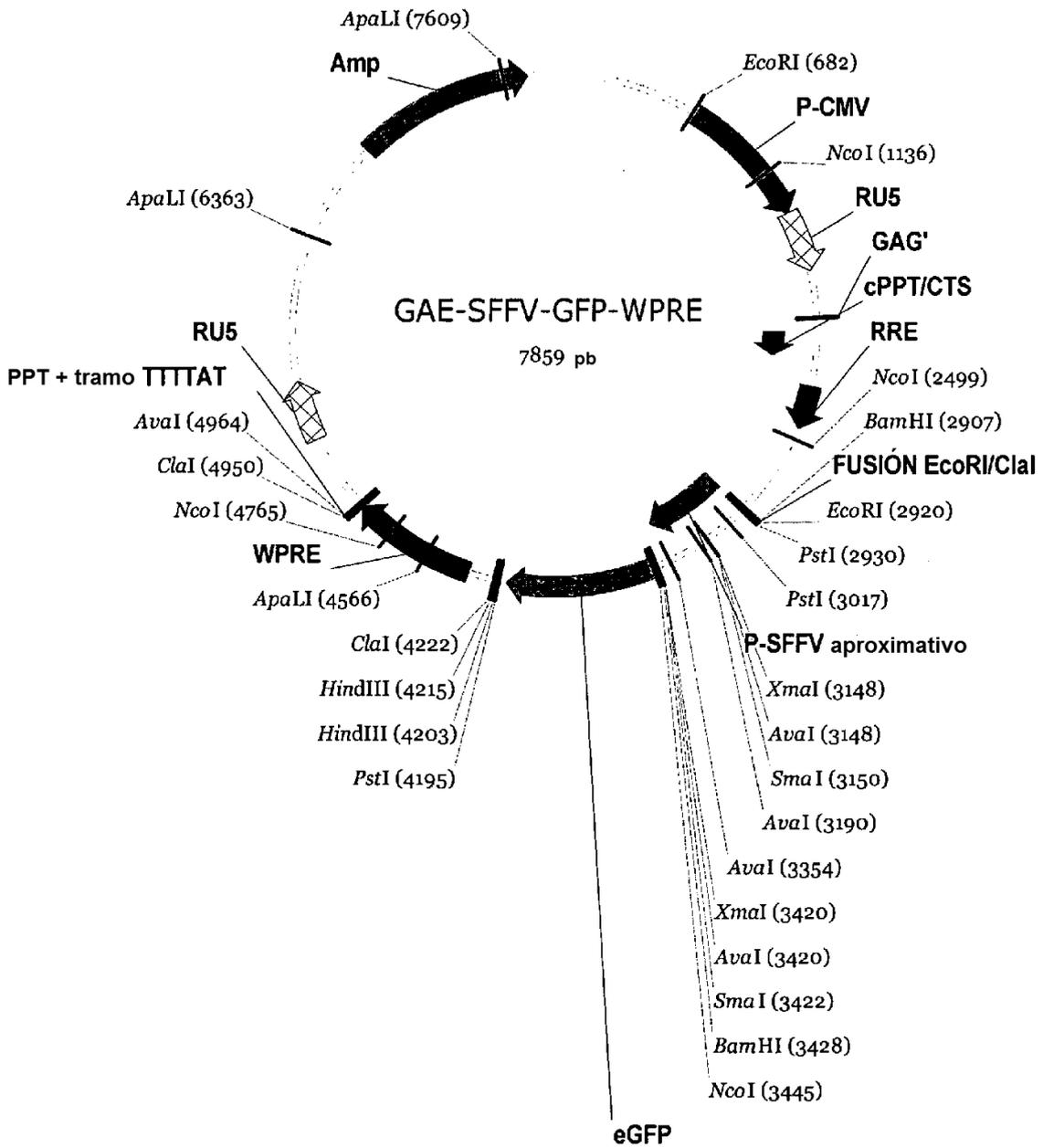


Fig. 24

