

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 184**

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2011 E 11749849 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2480677**

54 Título: **Producción semiestable de vectores lentivíricos**

30 Prioridad:

02.09.2010 EP 10175088

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

03.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOVOLenta, CHIARA;
STORNAIUOLO, ANNA;
RIZZARDI, PAOLO y
MAVILIO, FULVIO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 184 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción semiestable de vectores lentivíricos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la producción de vectores lentivíricos (VL) para genoterapia. Más en particular, la invención se refiere a líneas celulares semiestables para empaquetamiento de lentivirus y a procedimientos para fabricar líneas celulares para empaquetamiento mediante el uso de un vector híbrido de baculovirus y dependovirus (AAV, por virus adenoasociado) para la integración estable de proteínas lentivíricas reguladoras y estructurales.

Antecedentes

10 Desde el primer ensayo clínico de fase I de VL contra el sida en 2001, se han sometido al escrutinio de las autoridades 38 ensayos de fase I-II y dos de fase II-III que explotan los VL basados en el VIH como vehículos de introducción de genes; tres de ellos están todavía en revisión. El número de ensayos más grande comprende trastornos monogénicos, algunos de los cuales tienen una gran incidencia, tal como la talasemia β mayor o anemia de Cooley (4 ensayos). Le siguen el cáncer y las enfermedades infecciosas, principalmente por el VIH-1. Lo habitual es que el número de pacientes que participen en los ensayos de fase I/II sea pequeño, pero no el de la fase III. Así pues, se necesitan con urgencia líneas celulares estables para empaquetamiento para los VL de segunda (basados en LTR) y de tercera (basados en SIN) generación para afrontar la demanda de producción a gran escala de VL para el gran número de ensayos de fase III que se espera que se realicen en el futuro. La producción de VL basados en protocolos transitorios es realmente poco práctico para la aplicación global desde un punto de vista de seguridad, coste y reproducibilidad.

20 Cada vez hay más pruebas que indican que los VL, los vectores integrativos víricos desarrollados más recientemente para la genoterapia, se pueden aplicar de forma general para transducir las células diferenciadas a término o en el ciclo celular, ideales para sostener la expresión de transgenes a largo plazo y más seguros de lo que se temía inicialmente. La experiencia acumulada sobre los vectores γ -retrovíricos (γ RV) del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) a lo largo de las dos últimas décadas guió el rápido progreso del sistema de introducción con VL, cuyo desarrollo se originó por la necesidad de superar la incapacidad del retrovirus para transducir las células que no se dividen. En particular, la generación de vectores de transferencia autoinactivantes (SIN, por su nombre en inglés) hace que sea más factible¹ la perspectiva de que los VL se usen ampliamente en los ensayos clínicos humanos dada la expansión y optimización de un procedimiento de fabricación muy eficaz. Sin embargo, a diferencia de los γ RV, que se pueden producir en varias líneas celulares para empaquetamiento comercialmente disponibles murinas y humanas, los VL se producen actualmente no sólo para investigaciones, sino también cumpliendo las normas de correcta fabricación, casi exclusivamente mediante transfección transitoria. Esta tecnología es cara, difícil de estandarizar y escalar, y requiere numerosas pruebas de validación posteriores. Además, el riesgo de formación de lentivirus capaces de replicarse, que posiblemente surgen por recombinación entre las secuencias víricas de las construcciones en los vectores de transferencia y para empaquetamiento, es un acontecimiento infrecuente, pero es más probable durante la producción transitoria que durante la estable.

40 El desarrollo de una línea celular estable para empaquetamiento de VL que sea equivalente a la retrovítica resultó ser más lento y más difícil porque, a diferencia de los retrovirus γ , la expresión de las proteínas lentivíricas, tales como env, proteasa y algunas proteínas accesorias, es tóxica para las células humanas. Para solucionar este problema, los genes accesorios, presentes en las primeras versiones de las células para empaquetamiento, se retiraron posteriormente en las últimas generaciones. Líneas celulares para empaquetamiento de VL basados en el VIS y en el VIH de primera generación se obtuvieron de las células adheridas Vero de mono o COS, HeLa y 293 de humano²⁻⁵, manipuladas genéticamente con genomas de lentivirus que llevan unas pocas modificaciones cruciales, tales como la retirada de la señal de empaquetamiento. De hecho, se mantuvieron la env gp120 y la mayoría de los genes accesorios. La titulación de los VL resultantes era muy baja²⁻⁵ y, lo más importante, la posible aplicación de estos vectores estaba restringida necesariamente a los linfocitos T CD4+ para las estrategias de genoterapia antisida. Más tarde, la env gp120 se sustituyó por la glucoproteína procedente del virus de la estomatitis vesicular (G-VSV) y se retiraron todos los genes accesorios, ya que se comprobó que eran prescindibles para una producción eficiente de VL. Para impedir la toxicidad también descrita para la G-VSV, su expresión se indujo condicionalmente mediante una serie de sistemas diferentes, tales como Tet, ecdisona, Rev y la combinación de Tet y cumato⁶. De igual forma, para reducir el efecto tóxico de la proteasa vírica durante la selección del clon, se ha descrito la expresión condicional del gen de gag-pol por Tet y la combinación de los fármacos doxiciclina y cumato⁶. En todos estos sistemas, los genes de gag-pol, de rev y de env se integraron mediante la transfección transitoria del ADN plasmídico y la posterior selección con el fármaco y la clonación celular.

55 Una de las cuestiones cruciales para la consolidación de una línea celular para empaquetamiento verdaderamente estable es la elección de los mejores vehículos víricos para la introducción de genes. La mayoría de los investigadores integraron los genes de gag-pol, de rev y de env mediante la transfección transitoria de ADN plasmídico, y la posterior selección con el fármaco y clonación celular²⁻⁹. Esta tecnología se sabe que acabará viéndose afectada con el tiempo por el silenciamiento génico y la pérdida génica¹⁰, que pueden poner en peligro la estabilidad a largo plazo del clon para empaquetamiento.

Se han descrito vehículos alternativos para la introducción de genes, en particular en STAR¹¹ y en las líneas celulares para empaquetamiento GPRG-TL-20¹² desarrolladas más recientemente, donde los genes de gag, pol y rev se integraron en las células HEK293T mediante vectores lanzadera de MLV. Se integraron de forma estable en STAR dos copias del gen de gag-pol recodificado, mientras que no se dispone de información para GPRG-TL-20¹².

5 A diferencia de STAR, donde se transfectó el gen de env, en GPRG-TL-20 se introdujeron todos los genes víricos restantes mediante SIN-MLV.

Existen varios sistemas que permiten la integración estable del genoma foráneo en las células hospedadoras. En Palombo et al., 1998¹³, se describe un vector híbrido baculovirus-AAV para la integración específica en las células hospedadoras. Tal vector es muy eficaz si incluye el gen de rep en el mismo vector híbrido baculovirus-AAV. No se menciona en esta referencia la construcción de la presente invención y mucho menos se sugiere el uso de esta clase de sistema para la producción de VL.

10

A lo largo de las últimas casi dos décadas, se han intentado varias veces generar líneas celulares estables para empaquetamiento de VL. A pesar de la diferente tecnología descrita, hoy en día ninguna de estas líneas celulares para empaquetamiento se emplea todavía en los ensayos clínicos ni se ha llegado a comercializar. Por lo tanto, se necesitan nuevos sistemas para la producción a gran escala de VL que sean eficaces en términos de capacidad de producción y que sean seguros, rentables y reproducibles.

15

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al campo de la producción de VL. Están en marcha varios ensayos clínicos de genoterapia que emplean los VL como vehículos para la introducción de genes. En todos estos ensayos, la producción de VL se basa todavía en protocolos transitorios.

20

La presente invención da a conocer una nueva estrategia para generar una línea celular para empaquetamiento basada en el VIH-1. Tal estrategia se basa en el uso de un vector híbrido que comprende un esqueleto baculovírico que contiene un casete de integración flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR, por su nombre en inglés) de AAV, el denominado sistema híbrido baculo-AAV, en combinación con un plásmido que codifica una proteína rep. Este sistema permite obtener una integración estable de gag/pol y rev, proteínas del VIH-1 reguladoras y estructurales. El sistema de la presente invención incluye a) un vector híbrido baculo-AAV caracterizado por contener dos casetes de expresión, uno que codifica los genes de gag y pol lentivíricas, y el otro la rev lentivírica y un marcador de selección, y b) un plásmido que codifica una proteína rep. El sistema propuesto representa un nuevo modo ventajoso para introducir proteínas del VIH estructurales y reguladoras para manipular genéticamente las células hospedadoras de forma eficaz y estable con proteínas lentivíricas estructurales. Con el uso de este sistema, se obtuvo un primer intermedio que incluye sólo gag/pol y rev, las proteínas del VIH estructurales y reguladoras, para ser usadas en la producción semiestable de VL, o como un punto de partida para obtener líneas celulares para empaquetamiento de segunda y tercera generación que incluye opcionalmente la proteína reguladora (Tat) y la proteína de envoltura de interés, así como líneas celulares productoras que incluyen también el vector de transferencia.

25

30

35

El primer intermedio lleva dos copias de la construcción recombinante para empaquetamiento de baculo-AAV que expresa los genes de gag-pol y rev del VIH-1 en una configuración tricistrónica. Tal intermedio se ha denominado PK-7 y se lo menciona como PK-7 en los ejemplos. La integración del vector baculo-AAV para empaquetamiento en el genoma se facilitó mediante la expresión transitoria de la proteína Rep78 del AAV que se sabe que se necesita para la integración del vector de AAV mediada por las ITR¹⁴. Tal primer intermedio mostró que tenía una sorprendente estabilidad genética durante 1 año de cultivo, lo que se ha demostrado por la producción continua de VL funcionales después de la transfección transitoria de los restantes elementos genéticos. Además, no se ha observado ningún fenómeno de silenciamiento en tales células. Es más, mediante el mapeo exacto del sitio de integración de los dos vectores de AAV para empaquetamiento integrados en tándem en una región transcripcionalmente activa intergénica que no es codificante, hemos proporcionado un argumento de seguridad contra la posible activación de los genes peligrosos cuyos ARNm se pueden incorporar en los VL y, finalmente, en las células hospedadoras destinatarias.

40

45

El sistema para empaquetamiento desarrollado que se basa en el uso de un vector híbrido baculo-AAV para la expresión estable de gag-pol y rev lentivíricas se ha denominado «MolPack». El sistema de expresión utilizado en la presente invención permite ventajosamente introducir de manera estable y segura las proteínas del VIH estructurales (gag/pol) y reguladora (rev), en una única ronda de clonación y transfección. La producción de VL que se emplea en la actualidad en los ensayos clínicos todavía se basa en la transfección transitoria de todas las proteínas necesarias. Por el contrario, el intermedio obtenido con el sistema de expresión de la presente invención es estable, no muestra fenómenos de silenciamiento y permite desarrollar una producción semiestable de VL con importantes ventajas desde el punto de vista económico. De hecho, la producción semiestable necesita que se transfecte un número reducido de construcciones para obtener el producto final. Además, también es un hallazgo destacable que, mediante la producción semiestable de la presente invención, baste con emplear tan solo un tercio de la cantidad de ADN de la producción con transfección transitoria para obtener VL que tienen un título comparable al de los VL producidos de forma transitoria. Es más, el menor número de construcciones que hay que transfectar reduce la posibilidad de que se recombinen para formar lentivirus capaces de replicarse, lo que hace que la

50

55

60

producción de partículas lentivíricas sea más segura. Así pues, el sistema de expresión, la línea celular semiestable para empaquetamiento y el procedimiento de producción de la presente invención son muy ventajosos con respecto a las herramientas y los procedimientos que se aplican en la actualidad en los ensayos clínicos.

Declaraciones de la invención

5 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se da a conocer un sistema para la expresión estable de las proteínas estructurales y reguladoras lentivíricas que consiste en:

i. Un vector híbrido que comprende un esqueleto baculovírico que contiene un casete de integración flanqueado por las ITR de AAV que incluyen dos casetes de expresión, en donde el primer casete de expresión codifica los genes de gag y pol lentivíricas y el segundo la rev lentivírica y un marcador de selección, y

10 ii. Un plásmido de expresión que contiene el marco abierto de lectura (ORF) de la rep de AAV bajo el control de un promotor.

Preferiblemente, los dos casetes de expresión del vector híbrido están orientados cola con cola y cada uno está impulsado por un promotor constitutivo y lleva un poli A, preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α SFFV y RSV, más preferiblemente el promotor es un promotor de CMV IE. Preferiblemente, el
15 marcador de selección se selecciona de gen de resistencia a higromicina, a kanamicina, a neomicina, a zeomicina, más preferiblemente el marcador de selección es el gen de resistencia a la higromicina.

Más preferiblemente, el marcador de selección está clonado detrás de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES, por su nombre en inglés).

20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer una línea celular semiestable para empaquetamiento de lentivirus que consiste en células que expresan de forma estable las gag, pol y rev lentivíricas, caracterizada por llevar integrada tales células de forma estable en su genoma al menos una copia de un casete de integración flanqueado por las ITR de AAV que incluye dos casetes de expresión, en donde el primer casete de expresión codifica los genes de gag y pol lentivíricas y el segundo la rev lentivírica y un marcador de selección.

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

Preferiblemente, los dos casetes de expresión están orientados cola con cola y cada uno está impulsado por un promotor constitutivo y lleva un poli A; preferiblemente, el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV y RSV, más preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor de CMV IE. Preferiblemente, el
30 marcador de selección se selecciona de gen de resistencia a higromicina, a kanamicina, a neomicina, a zeomicina; más preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a la higromicina. Más preferiblemente, el marcador de selección está clonado detrás de un IRES.

Preferiblemente, la proteína rep de AAV se selecciona de rep78 o rep68. Más preferiblemente, la proteína rep es rep78. De acuerdo con otro aspecto, se da a conocer un procedimiento para producir vectores lentivíricos que comprende:

35 i. Cultivar una línea celular semiestable para empaquetamiento de lentivirus que consiste en células que expresan de forma estable las gag, pol y rev lentivíricas caracterizadas por llevar integrada tales células de forma estable en su genoma al menos una copia de un casete de integración flanqueado por las ITR de AAV que incluyen dos casetes de expresión, en donde el primer casete de expresión codifica los genes de gag y pol lentivíricas y el segundo la rev lentivírica y un marcador de selección.

40 ii. Insertar en la línea celular semiestable para empaquetamiento un gen de env mediante un vector de expresión

iii. Insertar un vector de transferencia en la línea celular semiestable para empaquetamiento.

Preferiblemente, los dos casetes de expresión están orientados cola con cola y cada uno está impulsado por un promotor constitutivo y lleva un poli A; preferiblemente, el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV y RSV, más preferiblemente el promotor constitutivo es un promotor de CMV IE. Preferiblemente, el
45 marcador de selección se selecciona de gen de resistencia a higromicina, a kanamicina, a neomicina, a zeomicina; más preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a la higromicina. Más preferiblemente, el marcador de selección está clonado detrás de un IRES.

La proteína de envoltura se puede insertar en las células hospedadoras mediante un vector de AAV, un vector retrovírico, integración estable de plásmido o recombinación homóloga. Preferiblemente, el gen de env se inserta
50 mediante transfección transitoria con un plásmido.

Preferiblemente, el gen de env se selecciona de env G-VSV, env 4070 de MLV, env RD114, proteína química de envoltura RD114-TR, proteína química de envoltura RD114pro, env GP64 de baculovirus o env de GaLV o derivados de las mismas, más preferiblemente el gen de env es el gen que codifica la RD114-TR.

Preferiblemente, el vector de transferencia se inserta con un vector lentivírico SIN.

Descripción detallada de la invención

Una descripción detallada de las peculiaridades y realizaciones preferidas de la invención se describirá por medio de ejemplos no limitantes.

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

Sistema híbrido baculo-AAV

- 20 La presente invención da a conocer una nueva estrategia para generar una línea celular para empaquetamiento basada en el VIH-1. La optimización del sistema de producción para VL es una de las cuestiones críticas que necesita solventarse para el desarrollo de la medicina por genoterapia basada en tecnología de VL. A pesar del número creciente de ensayos clínicos que emplean esta tecnología, los VL todavía se producen, en tales ensayos, mediante protocolos de transfección transitoria. De este modo, la producción de VL es todavía muy cara e insatisfactoria para un gran número de pacientes. Por este motivo se ha investigado mucho para desarrollar líneas celulares estables para empaquetamiento para los VL. Una de las cuestiones críticas en el desarrollo de una línea celular estable para empaquetamiento de lentivirus es elegir el vehículo correcto para la manipulación genética de las células hospedadoras. En muchos casos, las células hospedadoras se han manipulado genéticamente con plásmidos, pero, en tales casos, también se han observado fenómenos de inestabilidad genómica y silenciamiento génico. Se han utilizado vectores retrovíricos para integrar de forma estable los genes de gag/pol y rev en otros dos casos. Ninguna de las líneas celulares estables para empaquetamiento desarrolladas hasta ahora se ha empleado para la práctica clínica.

- 30 La estrategia de la presente invención se basa en el uso de un sistema para la expresión estable de proteínas lentivíricas estructurales y reguladoras del VIH que consiste en un vector híbrido que comprende un esqueleto baculovírico que contiene un casete de integración flanqueado por las ITR de AAV que incluye dos casetes de expresión, en donde el primer casete de expresión codifica los genes de gag y pol lentivíricas, y el segundo la rev lentivírica y un marcador de selección; junto con un plásmido de expresión que contiene el ORF de la rep de AAV bajo el control de un promotor. La presencia del esqueleto de baculovirus permite hospedar un casete de integración grande y complejo que incluye dos casetes de expresión que codifican varias proteínas diferentes. El vector baculo-AAV para empaquetamiento resultante permite manipular genéticamente las células hospedadoras con las proteínas víricas que son necesarias para producir de forma estable y eficaz los VL, a través de una única infección.

- 40 La integración del vector baculo-AAV para empaquetamiento en el genoma se obtuvo mediante la expresión transitoria de la proteína rep de AAV. Este sistema permite obtener la integración de los vectores de AAV en una región intergénica transcripcionalmente activa que no es codificante, con lo que se excluye la activación de genes peligrosos cuyo ARNm se puede incorporar en los VL y finalmente en las células hospedadoras destinatarias.

El sistema propuesto representa un modo nuevo y ventajoso de manipular genéticamente de forma estable y eficaz las células hospedadoras con proteínas lentivíricas estructurales y reguladoras.

- 45 En una realización preferida, los dos casetes de expresión incluidos en la construcción para empaquetamiento baculo-AAV están orientados cola con cola, y cada uno está impulsado por un promotor constitutivo y lleva un poli A, preferiblemente el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α SFFV y RSV, más preferiblemente el promotor es un promotor de CMV IE. De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección incluido en el vector para empaquetamiento de AAV se selecciona de gen de resistencia a higromicina, a kanamicina, a neomicina, a zeomicina; preferiblemente, el marcador es el gen de resistencia a la higromicina; más preferiblemente, el marcador de selección está clonado detrás de un IRES.

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

- 55 Con este sistema fue posible obtener células manipuladas genéticamente que expresaran de forma estable las proteínas gag/pol y rev del VIH-1, y tales células se denominan la línea celular semiestable para empaquetamiento.

En particular, la presente invención describe y reivindica tales células manipuladas genéticamente y su uso para una producción semiestable de VL.

Línea celular semiestable para empaquetamiento

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

De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, el marcador de selección se selecciona de gen de resistencia a higromicina, a kanamicina, a neomicina, a zeomicina; preferiblemente, el marcador de selección es el gen de resistencia a la higromicina, más preferiblemente el marcador de selección está clonado detrás de un IRES.

15 Preferiblemente, la proteína rep de AAV se selecciona de rep78 y rep68. Más preferiblemente, la proteína rep es rep78. Las líneas celulares hospedadoras que se pueden manipular genéticamente para obtener la línea celular semiestable para empaquetamiento son las líneas celulares de humano seleccionadas de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa, más preferiblemente la línea celular es HEK293-T.

20 Tal línea celular semiestable para empaquetamiento es adecuada para la producción de una variedad potencialmente grande de VL, con diferentes env y diferentes vectores de transferencia en un sistema de producción semiestable. Así pues, representa una gran ventaja para una producción más eficaz de VL porque permite reducir los costes, no requiere utilizar ADN plasmídico que cumpla las normas de correcta fabricación para codificar las gag-pol y rev, y se reduce el riesgo de formación de lentivirus capaces de replicarse tras los acontecimientos de recombinación entre los plásmidos durante la transfección transitoria. La línea celular semiestable para empaquetamiento es una herramienta versátil y es más segura y económicamente más ventajosa que otras herramientas que se emplean en la actualidad en los ensayos clínicos para la producción de VL.

25 La línea celular semiestable para empaquetamiento de la presente invención demostró que tenía una sorprendente estabilidad genética durante 1 año de cultivo, lo que se ha demostrado con la producción continua de VL funcionales después de la transfección transitoria de los restantes elementos genéticos. Además, no se ha observado ningún fenómeno de silenciamiento, de hecho, tanto el título como la infectividad de los VL obtenidos mediante este intermedio permanecieron inalterados después de 1 año. Tales datos se confirmaron en presencia o ausencia de presión selectiva. Notablemente, no existe en la bibliografía ningún dato comparable en cuanto a la estabilidad de integración de un casete mediado por las ITR de AAV. La única información relacionada es que una línea celular de tipo fibroblasto procedente de médula ósea humana (células Detroit 6 de Ruddle) infectadas con el AAV de serotipo 2 de tipo silvestre (AVV-2) mantuvo las secuencias víricas en un estado latente durante al menos 47 y 118 pases. Tal y como se muestra en los ejemplos, la línea celular semiestable para empaquetamiento de la presente invención sobrevivió durante al menos 102 pases.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento para producir VL que comprende:

- i. Cultivar una línea celular semiestable para empaquetamiento como se describe más arriba.
- ii. Insertar en la línea celular semiestable para empaquetamiento un gen de env mediante un vector de expresión
- 40 iii. Insertar un vector de transferencia en la línea celular semiestable para empaquetamiento.

La proteína de envoltura se puede insertar en las células hospedadoras mediante un vector de AAV, un vector retrovírico, integración estable de plásmido o recombinación homóloga. Preferiblemente, el gen de env se inserta mediante la transfección transitoria con un plásmido.

45 Preferiblemente, el gen de env se selecciona de env G-VSV, env 4070 de MLV, env RD114, proteína quimérica de envoltura RD114-TR, proteína quimérica de envoltura RD114pro, env GP64 de baculovirus o env de GaLV, o derivados de las mismas. Más preferiblemente, la presente invención utiliza la proteína quimérica de envoltura env RD114-TR, en la que la cola citoplasmática de RD114 se ha reemplazado por la de la envoltura de MLV.

Preferiblemente, el vector de transferencia se inserta con un SIN-VL.

50 La línea celular semiestable para empaquetamiento de la presente invención es capaz de producir VL que en términos de infectividad son «cualitativamente» iguales a los producidos mediante la transfección transitoria. Una cuestión muy importante a considerar para la aplicación de la producción semiestable de VL es que la línea celular semiestable para empaquetamiento no perdió la capacidad de ser transfectable con facilidad. De hecho, las células PK-7 se transfectan al mismo nivel que la línea celular parental HEK293T. Este rasgo se pierde con mucha frecuencia después de la modificación genética y la clonación de las células HEK293 con la construcción para

empaquetamiento. Por el contrario, el sistema de expresión empleado en la presente invención para la integración estable de gag/pol y rev no ocasiona ningún problema a la transfectabilidad de la línea celular semiestable para empaquetamiento.

5 Además, la línea celular semiestable para empaquetamiento y su uso en el procedimiento de producción de VL tiene ventajas importantes relacionadas con los costes de producción. En particular, sólo se necesitan tres construcciones más, por ejemplo, plásmidos (cada uno codifica tat, env y el vector de transferencia) para la producción de VL de segunda generación, o dos construcciones (cada una codifica env y el vector de transferencia) para la producción de VL de tercera generación. Por el contrario, los procedimientos de buenas prácticas de fabricación empleados hoy en día en los ensayos clínicos requieren el uso de dos construcciones más, que codifican gag/pol y rev, respectivamente, además de las utilizadas con la línea celular semiestable para empaquetamiento de la presente invención.

Además, el menor número de construcciones que hay que transfectar con los procedimientos y herramientas de las presentes invenciones también representan una ventaja adicional para la seguridad de los VL, tal y como se describe más arriba.

15 Además, también es un hallazgo destacable que, mediante la producción semiestable de la presente invención, baste tan solo un tercio de la cantidad de ADN empleado en la producción por transfección transitoria para obtener lentivirus que tienen un título comparable al de los lentivirus producidos de forma transitoria. Así pues, el sistema de expresión, la línea celular semiestable para empaquetamiento y el procedimiento de producción de la presente invención son muy ventajosos con respecto a las herramientas y los procedimientos que se aplican en la actualidad en la práctica clínica.

Descripción de las figuras

Figura 1 Esquemas del desarrollo de RD-MolPack. (a) Representación esquemática de los ADN plasmídicos utilizados en el estudio. pPolh, promotor de polihedrina; attB1, adhesión B1; ITR, repetición terminal invertida; CMV, promotor del citomegalovirus; In, intrón; RRE, elemento de respuesta a rev; A, secuencia de polyA; IRES, sitio interno de entrada del ribosoma; SD, donante del ayuste; SA, aceptor del ayuste; Ψ, señal para empaquetamiento; WPRE, elemento regulador postranscripcional de la hepatitis de la marmota; cPPT, tramo central de polipurinas; hPGK, promotor de la fosfoglicerato cinasa de humano. (b) Dibujo de la integración genómica mediada por Rep78 del vector AAV-GPR. La Rep78 del AAV favorece la escisión del casete AAV-GPR flanqueado por ITR y facilita su integración en los cromosomas humanos. (c) Ordinograma de la producción mediante la línea celular semiestable para empaquetamiento. GOI, gen de interés.

Figura 2 Caracterización de los clones PK. (a) Análisis por transferencia Southern de la integración del vector AAV-GPR. Para establecer el número de copias y la integridad del casete, el ADN genómico (10 µg) procedente de los clones de PK se digirió con dos enzimas de restricción diferentes, BamHI y SnaBI, respectivamente. (b) Análisis por inmunotransferencia de las proteínas víricas producidas desde el casete GPR. Panel izquierdo, los extractos de células (50 µg/carril) obtenidos de los clones PK se hibridaron con un suero humano anti-VIH que reconoce las proteínas del VIH-1. La membrana se hibridó secuencialmente con un Ac específico anti-rev. Panel derecho, 30 ng de p24gag-equivalente de partículas de tipo vírico (VLP) producidas por clones PK se procesaron de la misma forma que los extractos celulares. (c) Mapeo esquemático de la integración del casete GPR mediante la técnica de LM-PCR que identificó el punto de rotura del ADN en la posición 2q32.1 del brazo largo del cromosoma 2. (d) Colocalización del casete AAV-GPR y el gen Hox4 humano en el cromosoma 2. La hibridación *in situ* de los cromosomas en metafase de PK-7 se realizó con una sonda específica de gag (rojo) y una sonda específica de Hox4 (verde), respectivamente. (e) Representación esquemática de la reorganización de los dos casetes integrados de GPR en el clon PK-7 y su orientación cola con cabeza.

Figura 3 Experimentos de control respecto a la posible integración de Baculo-AAV-GPR y Rep78. (a) Análisis por transferencia Southern del ADN recombinante de baculovirus-AAV. Se extrajo el ADN de las partículas de baculovirus, se digirió durante una noche con la enzima de restricción MluI y, después de la transferencia, se hibridó con la sonda específica del casete GPR de 11 kb. El plásmido Entry-GPR (1 pg) y el ADN vacío de baculovirus (100 ng) se cargaron como controles positivo y negativo, respectivamente. (b) Detección de la posible integración residual del ADN plasmídico de rep78 en las células PK-7. La PCR específica de Rep78 se llevó a cabo con el ADN genómico de PK-7 como muestra de molde y el plásmido CMV-rep78 (1 pg) como control positivo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimientos generales

Plásmidos

Los genes *gag*, *pol* y *rev* del VIH-1 de tipo silvestre se escindieron mediante digestiones con MluI/NarI y MluI/NotI a partir de los plásmidos pCG719-pKLgagpol (de aquí en adelante se denomina CMV-GPR por simplicidad) (figura 1a, esquema 9) y pCG720-pKrev (CMV-Rev) (figura 1a, esquema 5), respectivamente²⁵. Los genes víricos se insertaron en el vector lanzadera Gateway[®] pENTRT[™]4 (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA) en dos casetes de expresión distintos

orientados cola con cola, en donde cada casete está impulsado por un promotor CMV IE y lleva una secuencia de poli A. El primer casete expresa los genes *gag* y *pol* mientras que el segundo expresa el gen *rev* y el gen de resistencia a la higromicina (*hygro*), que es el marcador de selección; *hygro* se clonó detrás de un IRES para permitir la traducción bicistrónica. Las dos unidades de expresión se introdujeron en el sitio XbaI del plásmido recombinante pSUB201 que lleva un genoma de AAV infeccioso¹⁷. A continuación, el casete resultante 5'ITR-CMV-gagpol-poliA-poliA-hygro-IRES-rev-CMV-ITR3' se escindió y se insertó en el vector lanzadera Gateway® pENTRT™4 (Invitrogen, Co., Carlsbad, CA). El vector híbrido recombinante para empaquetamiento baculo-AAV (Baculo-AAV-GPR) (figura 1a, esquema 1) se obtuvo por medio del sistema de recombinación específico de sitio del bacteriófago λ entre el vector lanzadera de entrada pENTRT™4, que contiene los dos casetes, y el ADN lineal BaculoDirect (sistemas de expresión con baculovirus BaculoDirect™, Invitrogen, Co.). Durante la recombinación homóloga, el gen de la polihedrina del ADN del baculovirus fue reemplazado por el doble casete de GPR. Se obtuvo el plásmido de expresión pABCMV-rep78 (CMV-AAV-rep78) mediante clonación del ORF de la rep78 de AAV bajo el promotor CMV IE del vector de expresión pABS.43, según se describe en Recchia et al., 2004¹⁸ (figura 1a, esquema 4). El plásmido pMD.G (CMV-VSV-G)¹⁹ codifica la glucoproteína de envoltura del virus de la estomatitis vesicular (G-VSV) (figura 1a, esquema 6). El vector de transferencia de tercera generación, pCCLsin.PPT.hPGK.eGFP.WPRE.Amp (SIN-eGFP)²⁰ expresa el gen de eGFP bajo el promotor constitutivo de hPGK (figura 1a, esquema 2). El vector de transferencia de segunda generación PΔN-Chim3 que expresa el transgén Chim3 anti-VIH-1 se describe en Porcellini et al., 2009 y 2010^{21,22} (figura 1a, esquema 3). El plásmido pCMV-RD114-TR (CMV-RD114-TR) (figura 1a, esquema 7) codifica la envoltura quimérica RD114-TR, hecha de los dominios extracelular y transmembranario de la envoltura RD114 del retrovirus endógeno felino y la cola citoplasmática (TR) de A-MLVenv 4070A²³. La construcción para empaquetamiento de segunda generación pCMV-ΔR8.74 (CMV-GPRT) (figura 1a, esquema 8) que codifica los genes del VIH-1 *gag*, *pol*, *rev* y *tat*¹⁹.

Células

Las células del insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (Invitrogen, Co.) se hicieron crecer en suspensión en el medio TC-100 (Invitrogen, Co.) complementado con STF al 10% (EuroClone Ltd, Reino Unido) y una combinación de penicilina-estreptomina y glutamina (PSG) a 27 °C en ausencia de CO₂. Las células 293T de riñón de embrión humano (HEK293T) y su clon derivado (PK-7) se propagaron en el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con STF al 10% y PSG. Las células linfoblastoides T CEM A3.01 y SupT1 se hicieron crecer en RPMI 1640 complementado con STF al 10% y PSG. Los hemocitoblastos CD34⁺ y los leucocitos neonatales se purificaron a partir de la centrifugación de sangre de cordón umbilical (SCU) en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega). Después de la separación en el gradiente, los hemocitoblastos CD34⁺ se aislaron del anillo de células mononucleadas de SCU recogidas por selección positiva con el kit de CD34 MicroBeads y las columnas separadoras MiniMACS (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA). Se determinó la pureza de las células CD34⁺ (>92%) mediante análisis por FACS (FACSCalibur BD Bioscience, San Jose, CA) y el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR), con el Ac anti-CD34-PE (BD Pharmingen™, San Diego, CA). Las células CD34⁺ se estimularon previamente durante 24 horas en el medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) con suero al 20% que contiene 100 ng/ml del factor de células madre de humano (h-SCF) (R&D Systems, Minneapolis, MN), 100 ng/ml de h-Flt3L (Peprotech, Rocky Hill, NJ), h-IL-6 20 ng/ml (R&D Systems) y 20 ng/ml de trombopoyetina humana (h-Tpo) (Peprotech) y se mantuvo en el mismo medio durante la transducción. Se estimularon los leucocitos neonatales durante 48 horas con el anti-CD3 soluble de humano (30 ng/ml) (Orthoclone OKT3, Janssen-Cilag, Reino Unido) y 50 U/ml de IL-2 humana recombinante (rhIL-2) (Chiron, Emeryville, CA) en RPMI y a continuación se mantuvo en RPMI complementado con STF al 10%, PSG y rhIL-2.

Producción de baculovirus e infección de las células HEK293T con baculo-GPR

El baculovirus, que lleva el ADN genómico híbrido y recombinante de Baculo-AAV-GPR, se produjo siguiendo el procedimiento de BaculoDirect con el sistema Gateway® adaptado al ADN de baculovirus (Invitrogen, Co.). Se evaluó el título del baculovirus recombinante mediante el ensayo de placas y correspondió a 1×10^{11} ufp/ml después de tres pases de amplificación vírica en las células Sf9. El clon PK-7 se obtuvo por transfección de $1,5 \times 10^6$ células HEK293T con 4 μg del plásmido de expresión AAV-rep78 y 24 horas después se infectó con el Baculo-AAV-GPR recombinante a una Mdl de 1000. Las células se mantuvieron sin higromicina durante 4 días y a continuación se inocularon 5×10^5 células en 22 placas de 10 cm en presencia de higromicina (100 μg/ml) en concentraciones diluidas en serie. Las 22 placas se cribaron mediante ELISA por la producción de p24gag. Sólo una placa, en la que las células se inocularon a $3,7 \times 10^4$ células/placa, liberaron suficiente p24gag al sobrenadante. La placa contenía 40 colonias que se recogieron y cribaron. Tres de ellas, que dieron positivo para la producción de p24gag, se caracterizaron adicionalmente.

55 Producción y titulación del vector lentivírico (VL)

Los VL seudotipados de las células HEK293T se obtuvieron mediante la cotransfección transitoria de los plásmidos siguientes: las construcciones para empaquetamiento CMV-GPR (tercera generación) [o CMV-GPRT (segunda generación)], las construcciones de envoltura G-VSV o RD114-TR y el SIN-eGFP²⁴ de tercera generación o el vector de transferencia de segunda generación PΔN-Chim3²¹. La proporción de empaquetamiento:envoltura:vector de transferencia fue de 6,5:3,5:10 μg de ADN a menos que se indique otra cosa. Los VL del clon PK-7 se generaron por cotransfección del plásmido que expresa env y el vector de transferencia. Las transfecciones transitorias se

realizaron con el procedimiento estándar de fosfato de Ca^{++} o bien con el sistema Fugene™6 siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) y se obtuvieron unos resultados parecidos. Los sobrenadantes se recogieron 48 horas después de la transfección y se filtraron a través de un filtro de 0,45 μm . El título se calculó en SupT1, CEM A3.01, células mononucleadas de la sangre periférica (CMSP) activadas primarias y hemocitoblastos $\text{CD}34^+$ procedentes de la sangre de cordón umbilical según el tipo de experimento. Brevemente, las células SupT1 y las mononucleadas primarias activadas se transdujeron mediante dos ciclos de inoculación por centrifugación (1,240 xg durante 1 hora) en presencia de polibreno (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) separados por una fase de reposo durante una noche; los hemocitoblastos $\text{CD}34^+$ se transdujeron durante 24 horas en placas revestidas con retronectina (Takara Bio, Otsu, Japón) sin polibreno. La eficacia de la transducción se siguió por análisis de citometría de flujo (FACS Calibur BD Bioscience, San José, CA) de la expresión de eGFP (SIN-eGFP), o de la expresión de ΔLNFR ($\text{P}\Delta\text{N}$ -Chim3), como se describe en Porcellini et al., 2009 y 2010^{21,22}, mediante el programa informático FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Sólo se utilizaron los valores de transducción que oscilaban de 5 al 20% de células positivas para calcular el título de cada preparación de VL de acuerdo con la fórmula siguiente: $\text{TU} = [\text{número de células} \times (\% \text{ GFP}/100)]/\text{vol sup}$ (en ml).

15 **Análisis por transferencia Southern**

El ADN genómico (ADNg) se aisló mediante el kit QIAamp Mini (QIAGEN GmbH, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN del baculovirus se extrajo de las partículas víricas mediante el kit QIAamp DNA micro (QIAGEN). Después de la digestión durante una noche con las enzimas de restricción indicadas, se migraron 10 μg de ADNg en gel de agarosa al 0,8%, se pasó mediante transferencia capilar Southern a membranas de nilón (Duralon, Stratagene, TX, EE.UU.) y luego se hibridaron a 1×10^6 dpm/ml de cebadores aleatorios marcados con ^{32}P para el casete de 600 pb de CMV o bien el de 11 kb de GPR.

20 **Análisis por PCR analítica**

El análisis por PCR para el cribado de la integración residual del plásmido AAV-Rep78 en las células PK-7 se realizó en 300 ng de ADN genómico con el conjunto de cebadores: AAV-Rep78 directo: 5'-CGG GCT GCT GGC CCA CCA GG-3'; AAV-Rep78 inverso: 5'-ATG CCG GGG TTT TAC GAG ATT GTG-3' y las siguientes condiciones de PCR: 98 °C durante 7 minutos, 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 66 °C durante 30 s y 72 °C durante 1,5 minutos.

Para determinar la orientación de los dos casetes de GPR, la amplificación por PCR se realizó en 300 ng de ADNg con el conjunto de cebadores: rev directo: 5'- CTT GAG GAG GTC TTC GTC GC-3'; globina β inverso: 5'- CCC TGT TAC TTC TCC CCT TCC -3'; rev directo anidado: 5'- TGT CTC CGC TTC TTC CTG CC-3'; globina β inverso anidado: 5'- TTA ACC ATA GAA AAG AAG GGG-3' y las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s y 72 °C durante 1,5 minutos.

30 **ELISA de p24gag**

La producción física de VL se midió en los sobrenadantes de cultivo mediante el kit para ELISA Alliance VIH-1 p24 Antigen (Perkin Elmer Life y Analytical Sciences, Inc. Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la suposición de que 1 pg de p24gag corresponde a 1×10^4 partículas físicas.

35 **Análisis por inmunotransferencia**

Se prepararon los extractos nucleares y de células completas procedentes de células PK-7 y proteínas víricas procedentes de VL o VLP sin células aislados tal y como se describió anteriormente^{21,22}. Las proteínas se fraccionaron por tamaños mediante SDS-PAGE, y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL (GE Healthcare, Life Sciences, UK Ltd, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% y luego se incubó con el Ac primario adecuado. El suero anti-VIH, obtenido de un paciente con sida, se utilizó a una dilución de 1:2000; el AcM contra la rev del VIH-1 (Rev-6, sc-69730 S. Cruz Biotechnology, Inc., S. Cruz, CA) a una dilución de 1:200. La fijación del Ac se visualizó mediante el sistema de quimioluminiscencia realizada ECL (ECL, Amersham) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

45 **Cuantificación del número de copias del ADN de VL mediante PCR en tiempo real con TaqMan**

El número de copias del vector de GPR integrado se determinó mediante PCR cuantitativa con TaqMan en un instrumento ABI Prism 7,900 FAST (Applied Biosystems, Foster City, CA) y se analizó mediante el programa informático SDS 2.3 (Applied Biosystems). El ADN genómico (ADNg) se amplificó con los siguientes cebadores y la sonda procedente del gen *gag*: directo: 5'-ACA TCA AGC AGC CAT GCA AAT-3'; inverso: 5'-ATC TGG CCT GGT GCA ATA GG-3'; sonda: FAM 5'-CAT CAA TGA GGA AGC TGC AGA ATG GGA TAG A-3' TAMRA. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 2 minutos a 50 °C y 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 15 s a 60 °C, con un incremento de 0,1 °C/ciclo.

50 **PCR mediada por ligación (LM-PCR)**

El ADN genómico se extrajo de células PK-7 mediante el kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se digirió con BgIII y BamHI a 37 °C durante una noche. La ligación de un conector

oligonucleotídico adaptador de 76 pb compatible con los extremos cohesivos 5'-GATC-3' se realizó en las condiciones estándares. La LM-PCR se realizó con la siguiente pareja de cebadores anidados: el LTR directo: 16s: 5'-GTA GCA TGG CGG GTT AAT CA-3', y 17s/largo anidado: 5'-TTA ACT ACA AGG AAC CCC TAG TGA TGG-3'; los cebadores inversos conectores: Conector 1: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3' y el Conector 2 anidado: 5'-AGG GCT CCG CTT AAG GGA C-3'. Las secuencias conectoras correspondían a 5'-GAT CGT CCC TTA AGC GGA GCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA CCA GGG AAT TCG CCT CGG GAT ATC ACT CAG CAT AAT G-3'. Se llevaron a cabo dos rondas de LM-PCR con la ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), en donde cada una comprende 30 ciclos (95 °C durante 30 s, 52 °C durante 30 s, 72 °C durante 2 minutos). Los amplicones de la PCR se clonaron con el kit de clonación TOPO[®] (Invitrogen, Co.) y las colonias con plásmidos que llevan insertos de aproximadamente 100 a 200 pb se seleccionaron para la secuenciación. Las homologías de secuencia se identificaron mediante una búsqueda con BLAST, del NCBI.

Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Los cromosomas en metafase se obtuvieron mediante el tratamiento de las células PK-7 con colchicina (10 µg/ml) (Sigma n.º C9754) durante 2 horas a 37 °C. Después del lavado con solución salina tamponada con fosfato (PBS), las células se mantuvieron en una solución hipotónica (KCl a 75 mM) durante 6 minutos a temperatura ambiente (TA), se fijaron con 4 lavados de metanol/ácido acético (3:1) y a continuación se extendieron sobre un portaobjetos de cristal limpio. Las muestras citogenéticas se desnaturalizaron en una solución de formamida al 70% durante 2 minutos a 72 °C, de deshidrataron mediante lavados consecutivos con etanol frío al 70%, 85% y 95%, y a continuación se secaron al aire. Las sondas específicas se prepararon como sigue: el ADN plasmídico de 13 kb que contiene el casete GPR se marcó utilizando el kit de marcación de ADN Random Primed (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) con Spectrum Orange[™]-dUTP (Vysis, Inc., Downers Grove, IL), mientras que el ADN del cósmido de 30 kb de control que contiene el gen *hox4* de humano se marcó con el kit de marcación de ácido nucleico FISHBright[™] (Kreatech Biotechnology, Amsterdam, Países Bajos). La hibridación se realizó mediante la incubación de 5 ng/µl de cada sonda en 250 µl de formamida al 50%, 2 x SSC, y sulfato de dextrano al 10%, y 50 ng/µl del tampón de hibridación de ADN C₀T-1 humano (Invitrogen). Las muestras se recubrieron con sondas desnaturalizadas durante 10 minutos a 75 °C, se cubrieron con Parafilm[®]M y se incubaron durante una noche a 37 °C en una cámara con humedad. Las muestras se lavaron una vez en SSC a 0,4 x, pH = 7, a 72 °C durante 2 minutos, una vez en SSC a 4 x, pH = 7, con Tween-20 al 0,0025% durante 30 s a TA y dos veces en PBS a 1 x durante 1 minuto a TA. Los portaobjetos se contratiñeron con 0,02 µg/µl de 49,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma). La visualización y las imágenes fotográficas se tomaron con un microscopio vertical Nikon 80i (Nikon Instruments S.p.A., Italia) con una iluminación filtrada en verde (FITC) y en el espectro naranja (spectrum orange). Las imágenes se procesaron con el programa informático Genikon (Nikon).

Ejemplo 2: Generación del primer clon PK-7 intermedio

Para obtener la línea celular para empaquetamiento RD-MolPack para la producción continua de VL de segunda o tercera generación, se obtuvieron varios clones intermedios procedentes de HEK293T. El primero se denominó PK-7 y se obtuvo mediante la integración estable de los genes *gag*, *pol* y *rev* del VIH-1 por medio del vector híbrido recombinante baculo-AAV (rhBaculo-AAV-GPR) (figura 1a, esquema 1). Este sistema de introducción explota la actividad integrasa de la proteína rep78 de AAV, proporcionada transitoriamente, para cortar e integrar los casetes de integración flanqueados por las ITR de AAV en los cromosomas humanos (figura 1b). El vector rh-baculo-AAV se generó mediante recombinación homóloga entre el ADN lineal BaculoDirect y el plásmido de entrada Gateway[®] pENTR[™]4 que contiene los casetes de GPR flanqueados por las ITR (figura 1a, esquema 1). Tras 3 ciclos (p3) de amplificación de baculovirus recombinantes en las células de insecto Sf9, el título y las posibles recombinaciones del ADN del híbrido baculo-AAV se comprobaron mediante el ensayo de placas y el análisis por transferencia Southern del ADN genómico vírico, respectivamente. El título a p3 correspondía a 6×10^{10} ufp/ml y el análisis por transferencia Southern reveló una única banda nítida, lo que demostró que no se produjo ninguna recombinación durante el procedimiento de amplificación del virus (figura 3).

A continuación se definieron cuidadosamente la dosis y el tiempo de transfección del plásmido AAV-Rep78 y de la infección de rh-baculo-AAV y las condiciones de clonación de las células HEK293T infectadas (figura 1c). De hecho, la elección de estos ajustes experimentales resultó ser decisiva. Así pues, tras comprobar un intervalo amplio de condiciones, se determinó finalmente que el mejor diseño experimental se correspondía con una dosis única del ADN plasmídico de AAV-rep78 transfectada 24 horas antes de la infección con rh-baculo-AAV a una Mdl de 1000. Además, se observó que la mejor condición para recoger el mayor número de clones celulares era inocular un total de 5×10^5 células distribuidas en 22 placas de Petri de 90 mm, en donde cada placa se inculaba a una concentración diferente, y se les añade higromicina a 100 µg/ml al cabo de 4 días de inoculación. Sólo tres de los 360 clones contados, PK-7, PK-17 y PK-18, expresaban la p24gag por encima del umbral establecido de 100 pg/ml. El análisis por transferencia Southern de los clones reveló que cada clon contenía dos copias de vector con un tamaño correcto (figura 2a). Para descartar la posible integración del ADN plasmídico de AAV-rep78 residual, se llevó a cabo una PCR específica de rep78 en el ADNg de PK-7 que no detectó ninguna señal positiva (figura 3b). El patrón de expresión de proteínas del VIH-1 procedente del casete GPR se siguió mediante inmunotransferencia de los tres clones PK y de las partículas de tipo vírico (VLP) compatibles que liberan al medio. Todas las proteínas víricas se procesaron adecuadamente, tenían el tamaño correcto y en la proporción relativa correcta (figura 2b). El futuro clon PK de trabajo se seleccionó calculando en las células SupT1 la potencia de los VL producidos por los tres

clones después de haberse contransfectado con el plásmido con la G-VSV y el vector de transferencia de tercera generación SIN-eGFP (tabla 1). Cabe destacar que, aunque el título del VL de HEK293T de control producido mediante la transfección transitoria era 5 veces más elevado que el del VL de PK-7 y PK-18, su infectividad era casi idéntica a la del VL de PK, lo que indica que los clones PK generan VL que, desde el punto de vista de «calidad», son comparables a los producidos por los procedimientos convencionales (tabla 1). Aunque la potencia de los VL de PK-7 y de PK-18 era parecida, el clon PK-7 se seleccionó para la manipulación genética posterior ya que su aspecto, crecimiento, viabilidad y valores de producción de p24gag puntuaban mejor que los del clon PK-18 (tabla 1).

Tabla 1. Potencia del VL seudotipado por la G-VSV producido por los clones PK

Clones	Título (UT/ml) ^a
PK-7^b	1,1 × 10⁷
PK-17	5,4 × 10 ⁶
PK-18	1,0 × 10 ⁷
HEK-293T	5,8 × 10 ⁷
p24Gag (ng/ml)	
PK-7	406
PK-17	636
PK-18	326
HEK-293T	1694
Infectividad (UT/ng de p24Gag)	
PK-7	2,7 × 10⁴
PK-17	8,4 × 10 ³
PK-18	3,0 × 10 ⁴
HEK-293T	3,4 × 10 ⁴

^aEl título se calculó en las células SupT1 3 días después de la transducción. Las células se transfectaron con los plásmidos con la G-VSV y SIN-eGFP.
^bLa negrita señala el clon seleccionado.

A continuación, la integración del casete GPR flanqueado por ITR se caracterizó en profundidad en el clon PK-7 mediante LM-PCR cuantitativa, PCR con TaqMan (figura 2c) y técnicas de FISH (figura 2d). Para mapear con exactitud el sitio de integración, se llevaron a cabo estudios de LM-PCR, que revelaron el punto de rotura en el cromosoma 2, 2q32.1 (figura 2c). Este resultado se confirmó mediante hibridación *in situ* con la sonda de GPR específica que reveló un solo punto en el cromosoma 2 basándose en la longitud del brazo y la posición del centrómero (figura 2d). Para confirmar esta asignación de la posición, se utilizó la sonda HOX4, que se sabe que mapea en el cromosoma 2q31.2. Como las células HEK293T son triploides, HOX4 se detectó correctamente en los tres cromosomas 2 (figura 2d). Finalmente, se confirmó por PCR cuantitativa con TaqMan que se habían integrado dos copias, y mediante PCR anidada con un diseño adecuado de los cebadores (figura 2e) que las dos copias estaban orientadas en tándem, cola con cabeza. La orientación de cola con cabeza es la configuración natural observada también para la integración del AAV de tipo silvestre y la mayoría de los concatémeros del vector rAAV en el genoma de la célula hospedadora¹⁶. El análisis de secuencia del amplicón que abarca la unión de la cola con la cabeza reveló que se perdieron un fragmento de 910 pb que comprende 303 pb del promotor de CMV en 3' del primer casete junto con las ITR del primer y segundo casete y el promotor completo de CMV en 5' del segundo casete (figura 2e, caja roja). La mayoría de las recombinaciones del vector en el interior de las células se producen, de hecho, dentro de las secuencias ITR del vector. Esta reorganización ha ocasionado en las células PK-7 la ausencia de transcripción del gen *gag-pol* del segundo casete y posiblemente la ausencia de transcripción de los genes *rev* e *hygro* del primer casete. Sin embargo, vale la pena mencionar que la región de 285 pb que queda del promotor de CMV deletado (figura 2e, triángulo gris en el centro del esquema) todavía contiene la caja TATA que podría ser suficiente para impulsar la transcripción de los genes *rev* e *hygro*. En conclusión, PK-7 contiene dos casetes integrados, que conjuntamente transcriben un gen *gag-pol* y uno o dos genes *rev* e *hygro*.

Para demostrar la estabilidad del clon PK-7 con el tiempo, las células se cultivaron en presencia o ausencia de higromicina durante 350 días, lo que corresponde a aproximadamente 420 duplicaciones celulares, y se midió la producción de p24gag en cada célula (tabla 2). La producción media en presencia de higromicina corresponde a

15,34 ± 8,47 DE ng de p24gag/1 × 10⁶ células, mientras que en ausencia del antibiótico es de 6,70 ± 3,51 DE ng de p24gag/1 × 10⁶ células (tabla 2).

5 Esta diferencia probablemente procede del hecho de que la presión del fármaco higromicina mantiene en un estado «operativo» la transcripción del gen de resistencia a la higromicina y, por este motivo, también de la cromatina. Esto podría favorecer la transcripción más elevada de los genes *gag-pol*. Para evaluar si las VLP generadas a partir del clon PK-7 eran funcionales incluso después de cientos de duplicaciones, las células PK-7 se cotransfectaron a p60 y p102 con la envoltura G-VSV y el vector de transferencia SIN-eGFP, y se calculó la potencia de los VL en las células SupT1. Notablemente, el título y la infectividad de los VL producidos en presencia y ausencia de selección con el fármaco persistieron al nivel normal incluso después de un tiempo tan prolongado (tabla 2). Estos datos muestran que no existe inestabilidad genética del casete de GPR independientemente de la presencia o ausencia de la presión del fármaco y nos permitió evitar el uso de la higromicina en la caracterización futura. No existe en la bibliografía ningún dato comparable en cuanto a la estabilidad de integración de un casete mediado por las ITR de AAV. La única información relacionada es que una línea celular de tipo fibroblasto procedente de médula ósea de humano (células Detroit 6 de Ruddle) infectadas con el AAV de serotipo 2 de tipo silvestre (AVV-2) mantuvo las secuencias víricas en un estado latente durante al menos 47 y 118 pases^{22,23}. En especial, las células PK-7 sobrevivieron durante al menos 102 pases.

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

	Higromicina	Sin higromicina
Pase	p24Gag ng/10^{6a}	p24Gag ng/10^{6a}
P2	10,00	8,10
P6	7,00	4,80
P10	11,40	4,00
P16	5,00	4,80
P20	9,30	5,20
P24	7,20	6,50
P28	9,20	4,40
P32	6,20	8,80
P36	11,00	9,60
P40	18,00	10,00
P44	4,30	8,40
P48	37,50	3,80
P52	7,00	3,20
P56	11,00	6,70
P60	19,00	4,40
P64	22,00	18,70
P68	15,20	8,00
P72	16,50	4,90
P76	17,80	7,60
P80	30,00	11,00
P84	27,00	8,40
P88	23,20	3,50
P92	23,00	7,50
P98	16,70	1,36
P102	19,00	3,85
Media ± DE	15,34 ± 8,47	6,70 ± 3,51

	Título (UT/ml) ^b	
P60	$3,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
P102	$2,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
	p24Gag (ng/ml) ^b	
P60	86	38
P102	80	13
	Infectividad (UT/ng p24Gag) ^b	
P60	42×10^4	52×10^4
P102	$3,3 \times 10^4$	10×10^5

^aLa cantidad de p24Gag está expresada como ng/1 × 10⁶ células
^bLos valores de potencia de VL seudotipados por G-VSV producidos después de la transfección de las células PK-7 con los plásmidos SIN-eGFP y con la G-VSV, y se analizaron en las células SupT1 3 días después de la transducción.

Ejemplo 3: Uso del clon PK-7 para la producción semiestable de VL

5 Para determinar mejor si la producción semiestable de VL a partir del clon PK-7 era en conjunto comparable a la de la producción transitoria de VL en las células HEK293T, ambos tipos celulares se transfectaron con la misma cantidad de los plásmidos necesarios y se midió el porcentaje de transfección y la potencia de sus respectivos VL en diferentes células destinatarias (tabla 3). En esta condición, la media del porcentaje de transfección de los 11 experimentos con las células HEK293T fue de $90,54 \pm 3,6$ EEM y la de los 12 experimentos con las células PK-7 fue de $91 \pm 5,3$ EEM, lo que indica que las células PK-7 mantienen su elevada capacidad de transfección. A 10 continuación, la titulación de los VL se calculó en las células SupT1, como nuestro tipo celular de referencia estándar, hemocitoblastos CD34+ procedentes de sangre de cordón umbilical y células mononucleadas de sangre de cordón umbilical activadas con anti-CD3/IL-2 (indicado como linf. T en la tabla 3) (tabla 3).

Tabla 3. Potencia de los VL de 2.^a y 3.^a generación seudotipados por G-VSV que se producen a partir del clon PK-7 calculada sobre diferentes tipos de células destinatarias

Vector	Productor	SupT1	CD34 ⁺	Linf. T
SIN-eGFP	PK-7 ^a	$5,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$
	HEK-293T ^b	$5,6 \times 10^7$	$3,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
	p24Gag (ng/ml)			
	PK-7	45	45	23
	HEK-293T	350	350	279
	Infectividad (UT/ng de p24Gag)			
	PK-7	$1,2 \times 10^5$	$5,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$
	HEK-293T	$1,6 \times 10^4$	$8,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^3$
		SupT1	CD34⁺	CEM A3.01
PΔN-Chim3	Título (UT/ml)			
	PK-7 ^a	$2,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4$	$3,7 \times 10^6$
	HEK-293T ^b	$5,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$8,8 \times 10^6$
	p24Gag (ng/ml)			
	PK-7	27	27	27
	HEK-293T	114	114	114
	Infectividad (UT/ng de p24Gag)			
	PK-7	$8,1 \times 10^4$	$5,1 \times 10^2$	$1,3 \times 10^5$
HEK-293T	$5,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2$	$7,7 \times 10^4$	

15 ^aLos VL seudotipados por G-VSV se produjeron después de la transfección de las células PK-7 con los plásmidos SIN-eGFP o PΔN-Chim3 y con envoltura G-VSV.
^bLos VL seudotipados por G-VSV se produjeron después de la transfección de las células HEK-293T con los plásmidos CMV-GPR, SIN-eGFP (o PΔN-Chim3) y con envoltura G-VSV.

Los VL se analizaron en las células destinatarias después de 3 a 5 días de la transducción.

5 Notablemente, la infectividad de los VL de tercera generación, SIN-eGFP, generados a partir de las células PK-7, fue de aproximadamente 1 logaritmo más bajo y casi igual a la del VL de control cuando el título se calculó en las células SupT1 y CD34⁺, respectivamente, mientras que era medio logaritmo más elevada en los linfocitos T activados. La infectividad de los VL de segunda generación, PΔN-Chim3, generados a partir de las células PK-7 fue casi igual a la del VL de control cuando el título se calculó en las células SupT1 o bien en las células CEM A3.01. En conjunto, estos hallazgos indican que el clon PK-7 produce VL «cualitativamente» iguales a los producidos por las células HEK293T cotransfectadas transitoriamente. Una cuestión muy importante a considerar para la aplicación de PK-7 en la producción semiestable de VL es que el clon PK-7 no perdió la capacidad de ser transfectable con facilidad. Este rasgo se pierde con mucha frecuencia después de la modificación genética y la clonación en las células 293 con la construcción para empaquetamiento.

15 Se llevaron a cabo experimentos de titulación para determinar la dosis de ADN total del plásmido con envoltura y el vector de transferencia a utilizar en la producción óptima de VL a partir de las células PK-7. En especial, se determinó que incluso menos de un tercio de la cantidad total de ADN (0,3 mg) era suficiente para generar VL con un título comparable al de los VL producidos con la cantidad estándar de ADN (1 mg) en las líneas celulares SupT1 y CEM A3.01. Por lo tanto, la utilización de las células PK-7 en vez de las HEK293T para la producción semiestable de VL recortará considerablemente el elevado gasto de ADN plasmídico que cumple las normas de correcta fabricación.

20 **Tabla 4. Reducción de la cantidad total de ADN plasmídico (a pequeña escala)**

ADN plasmídico	0,3 mg		0,6 mg		1 mg	
	SupT1	CEM A3.01	SupT1	CEM A3.01	SupT1	CEM A3.01
Título (UT/ml) ^a	1,2 × 10 ⁷	4,9 × 10 ⁶	1,1 × 10 ⁷	3,5 × 10 ⁶	1,0 × 10 ⁷	4,1 × 10 ⁶
p24Gag (ng/ml)	111	111	105	105	85	85
Infectividad (UT/ng de p24Gag)	1,0 × 10 ⁵	4,4 × 10 ⁴	1,0 × 10 ⁵	3,3 × 10 ⁴	1,1 × 10 ⁵	4,8 × 10 ⁴

^aTitulación de los VL producidos después de la transfección de las células PK-7 con el vector PΔN-eGFP y la envoltura G-VSV.

Referencias

- Schambach A, Baum C. «Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice». *Curr Gene Ther.* 2008; 8: 474-482.
- 25 2.- Carroll R, Lin JT, Dacquel EJ, Mosca JD, Burke DS, St Louis DC. «A human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based retroviral vector system utilizing stable HIV-1 packaging cell lines» *J Virol.* 1994; 68: 6047-6051.
- 3.- Yu H, Rabson AB, Kaul M, Ron Y, Dougherty JP. «Inducible human immunodeficiency virus type 1 packaging cell lines». *J Virol.* 1996; 70: 4530-4537.
- 30 4. Poeschla E, Corbeau P, Wong-Staal F. «Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy». *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 11395-11399.
5. Corbeau P, Kraus G, Wong-Staal F. «Efficient gene transfer by a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived vector utilizing a stable HIV packaging cell line». *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 14070-14075.
- 6.- Broussau S, Jabbour N, Lachapelle G, et al. «Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture». *Mol Ther.* 2008; 16: 500-507.
- 35 7.- Srinivasakumar N, Chazal N, Helga-Maria C, Prasad S, Hammarskjöld ML, Rekosh D. «The effect of viral regulatory protein expression on gene delivery by human immunodeficiency virus type 1 vectors produced in stable packaging cell lines». *J Virol.* 1997; 71: 5841-5848.
- 8.- Kaul M, Yu H, Ron Y, Dougherty JP. «Regulated lentiviral packaging cell line devoid of most viral cis-acting sequences». *Virology.* 1998; 249: 167-174.
- 40 9.- Cockrell AS, Ma H, Fu K, McCown TJ, Kafri T. «A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors». *Mol Ther.* 2006; 14: 276-284.
- 10.- Bestor TH. «Gene silencing as a threat to the success of gene therapy». *J Clin Invest.* 2000; 105: 409-411.

- 11.- Ikeda Y, Takeuchi Y, Martin F, Cosset FL, Mitrophanous K, Collins M. «Continuous high-titer HIV-1 vector production». *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 569-572.
- 12.- Throm RE, Ouma AA, Zhou S, et al. «Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection». *Blood.* 2009; 113: 5104-5110.
- 5 13. Palombo F, Monciotti A, Recchia A, Cortese R, Ciliberto G, La Monica N. «Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-Adeno-associated virus vector». *J Virol.* 1998; 72: 5025-5034.
14. Smith RH. «Adeno-associated virus integration: virus versus vector». *Gene Ther.* 2008; 15: 817-822.
15. Berns KI, Kort J, Fife KH, Grogan EW, Spear I. «Study of the fine structure of adeno-associated virus DNA with bacterial restriction endonucleases». *J Virol.* 1975; 16: 712-719.
- 10 16. Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI. «Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells». *J Virol.* 1980; 33: 739-748.
17. Samulski RJ, Chang LS, Shenk T. «A recombinant plasmid from which an infectious adeno-associated virus genome can be excised in vitro and its use to study viral replication». *J Virol.* 1987; 61: 3096-3101.
- 15 18. Recchia A, Perani L, Sartori D, Olgiati C, Mavilio F. «Site-specific integration of functional transgenes into the human genome by adeno/AAV hybrid vectors». *Mol Ther.* 2004; 10: 660-670.
19. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. «Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo». *Nat Biotechnol.* 1997; 15: 871-875.
20. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. «Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences». *Nat Genet.* 2000; 25: 217-222.
- 20 21. Porcellini S, Alberici L, Gubinelli F, et al. «The F12-Vif derivative Chim3 inhibits HIV-1 replication in CD4+ T lymphocytes and CD34+-derived macrophages by blocking HIV-1 DNA integration». *Blood.* 2009; 113: 3443-3452.
22. Porcellini S, Gubinelli F, Alberici L, Piovani BM, Rizzardi GP, Bovolenta C. «Chim3 confers survival advantage to CD4+ T cells upon HIV-1 infection by preventing HIV-1 DNA integration and HIV-1-induced G2 cell-cycle delay». *Blood.* 2010; 115: 4021-4029.
- 25 23. Sandrin V, Boson B, Salmon P, et al. «Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates». *Blood.* 2002; 100: 823-832.
24. Di Nunzio F, Piovani B, Cosset FL, Mavilio F, Stornaiuolo A. «Transduction of human hematopoietic stem cells by lentiviral vectors pseudotyped with the RD114-TR chimeric envelope glycoprotein». *Hum Gene Ther.* 2007; 18: 811-820.
- 30 25. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L. «A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system». *J Virol.* 1998; 72: 8463-71

REIVINDICACIONES

1. Sistema para la expresión estable de proteínas reguladoras y estructurales lentivíricas que consiste en:
 - i. Un vector híbrido que comprende un esqueleto baculovírico que contiene un casete de integración flanqueado por las ITR de AAV que incluyen dos casetes de expresión, en donde el primer casete de expresión codifica los genes de gag y pol lentivíricas y el segundo la rev lentivírica y un marcador de selección, y
 - 5 ii. Un plásmido de expresión que contiene el marco abierto de lectura (ORF) de la rep de AAV bajo el control de un promotor.
- 2.- Sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los dos casetes de expresión del vector híbrido están orientados cola con cola y cada uno está impulsado por un promotor constitutivo y lleva un poli A.
- 3.- Sistema de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV y RSV.
- 10 4. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el promotor es un promotor CMV IE.
5. Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador de selección se selecciona de gen de resistencia a higromicina, a kanamicina, a neomicina, a zeomicina.
- 6.- Sistema de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el marcador de selección es el gen de resistencia a la higromicina.
- 15 7.- Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador de selección está clonado detrás de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES, por su nombre en inglés).
- 8.- Sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína rep es rep78.
- 9.- Línea celular semiestable para empaquetamiento de lentivirus que consiste en células que expresan de forma estable gag, pol y rev lentivíricas, caracterizada por contener tales células integrada de forma estable en su genoma al menos una copia de un casete de integración flanqueado por las ITR de AAV que incluyen dos casetes de expresión, en donde el primer casete de expresión codifica los genes de gag y pol lentivíricas y el segundo la rev lentivírica y un marcador de selección.
- 20 10.- Línea celular semiestable para empaquetamiento de lentivirus de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la célula es una línea celular de humano seleccionada de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa.
- 25 11.- Línea celular semiestable para empaquetamiento de lentivirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en donde los dos casetes de expresión están orientados cola con cola y cada uno está impulsado por un promotor constitutivo y lleva un poli A.
- 12.- Línea celular semiestable para empaquetamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 11, en donde el promotor se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 α , SFFV y RSV.
- 30 13. Línea celular semiestable para empaquetamiento de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el promotor es un promotor CMV IE.
14. Línea celular semiestable para empaquetamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde el marcador de selección se selecciona de gen de resistencia a higromicina, a kanamicina, a neomicina, a zeomicina.
- 35 15. Línea celular semiestable para empaquetamiento de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el marcador de selección es el gen de resistencia a la higromicina.
16. Línea celular semiestable para empaquetamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde el marcador de selección está clonado detrás de un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES).
- 40 17. Procedimiento para producir vectores lentivíricos que comprende:
 - i. Cultivar una línea celular semiestable para empaquetamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16
 - ii. Insertar en la línea celular semiestable para empaquetamiento un gen de env mediante un vector de expresión
 - iii. Insertar en la línea celular semiestable para empaquetamiento un vector de transferencia.

18. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el gen de env se selecciona de env G-VSV, env 4070 de MLV, env RD114, proteína quimérica de envoltura RD114-TR, proteína quimérica de envoltura RD114-pro, env GP64 de baculovirus o env de GaLV, o derivados de las mismas.

19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en donde el gen de env es el gen que codifica la proteína quimérica de envoltura RD114-TR.

5

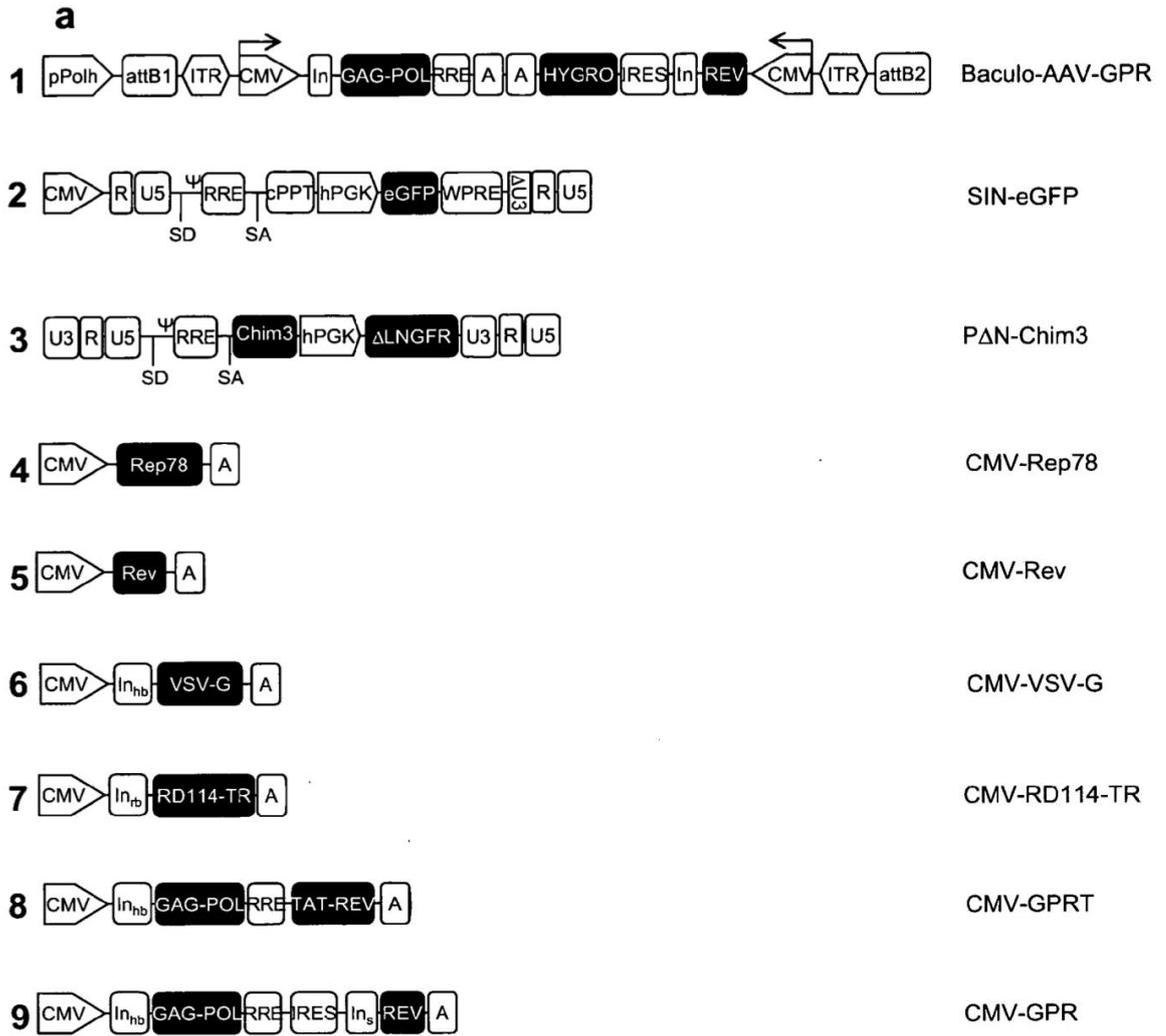
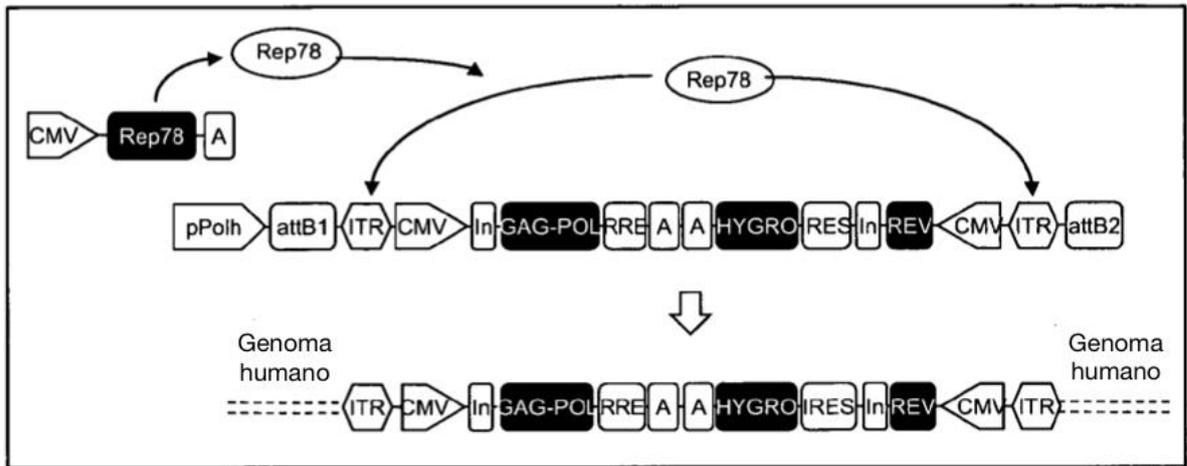


Figura 1

b



c

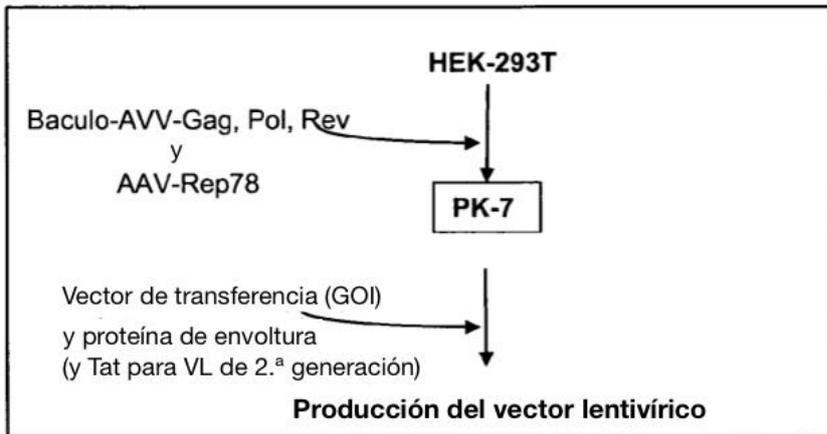


Figura 1

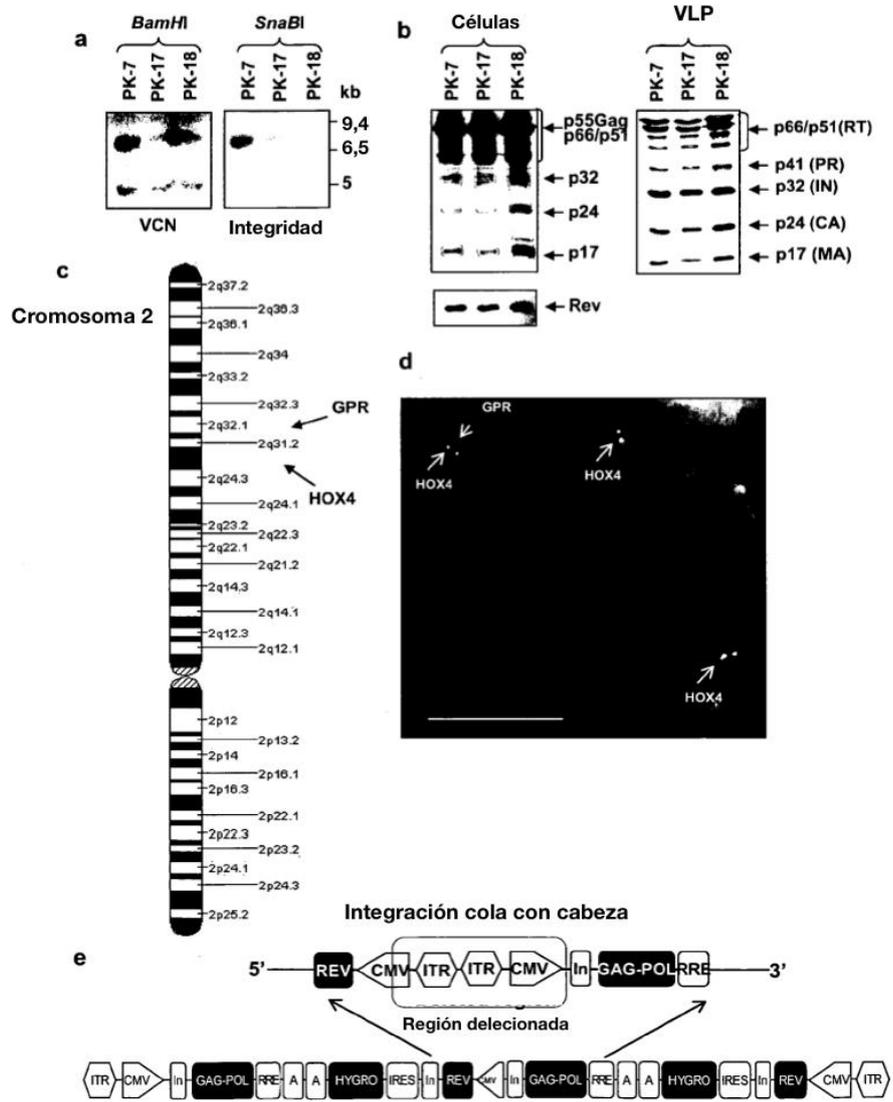
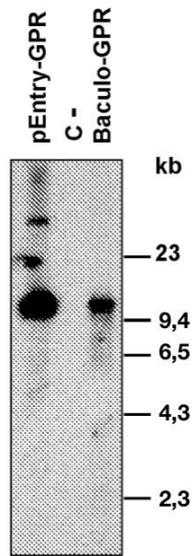


Figura 2

a



b

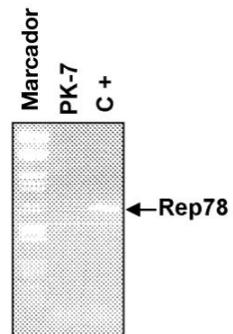


Figura 3