

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 823**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006 E 06795291 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 2002003**

54 Título: **Vector génico que comprende miARN**

30 Prioridad:

27.05.2005 US 684954 P

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

29.03.2016

73 Titular/es:

OSPEDALE SAN RAFFAELE S.R.L. (50.0%)
Via Olgettina 60
20132 Milano, IT y
FONDAZIONE TELETHON (50.0%)

72 Inventor/es:

NALDINI, LUIGI y
BROWN, BRIAN DAVID

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vector génico que comprende miARN

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vectores génicos para su uso en transferencia y aplicaciones de terapia génica, a métodos para producirlos, y sus usos.

10 Antecedentes de la invención

Los vectores lentivirales (LVs) y otros vectores virales son una herramienta fascinante de la terapia génica (Thomas *et al.*, 2003). Los LVs pueden transducir un amplio intervalo de tejidos, incluyendo células que no se dividen tales como hepatocitos, neuronas y células madre hematopoyéticas. Además, los LVs se integran en los genomas de las células diana y proporcionan una expresión transgénica duradera.

15 Aunque los LVs pueden proporcionar una transferencia génica eficiente y estable, sigue siendo difícil orientar selectivamente una expresión a, o desorientar selectivamente una expresión de un tipo celular específico. Este problema es particularmente relevante después de la administración *in vivo* del vector, en el que la expresión transgénica puede contenerse únicamente en una población celular específica, tal como células tumorales o hepatocitos, aunque se transduce un amplio espectro de tipos celulares. Asimismo, es importante desorientar selectivamente la expresión cuando se transducen células progenitoras o madre, pero es necesario tener la expresión transgénica restringida a un único linaje particular de la población diferenciada. Hasta la fecha, la mayoría de los esfuerzos por abordar este problema se han basado en orientar selectivamente la envoltura del vector o desarrollar por ingeniería genética los promotores específicos de tejido. Sin embargo, persisten limitaciones en ambos métodos.

20 Las envolturas dirigidas pueden reducir el título del vector y causar una disminución en la infectividad del vector (Sandrin *et al.*, 2003). Los promotores específicos de tejido, construidos en base a, pero no idénticos a, elementos promotores/potenciadores de origen natural, se expresan a menudo débilmente en tejidos diana en comparación con los promotores expresados ubicuamente. Además, estos promotores específicos de tejido no siempre obtienen una especificidad celular absoluta (Follenzi *et al.*, 2002). La expresión transgénica en las células no diana puede producirse por diversas razones, incluyendo actividad "parcial" del promotor y captura del promotor/potenciador (De Palma *et al.*, 2005). El fenómeno de captura se produce debido a que el vector se integra preferentemente en los sitios de transcripción activa, que a su vez, pueden mover la transcripción del transgén independientemente del promotor del vector.

30 A fin de eludir estos problemas y crear un vector que puede mantener una elevada infectividad y una expresión resistente, mientras permite al mismo tiempo la severa restricción de la expresión transgénica de tipos celulares particulares, se desarrolló un vector regulado por un microARN (miARN) expresado de forma endógena.

35 El documento WO03/020931 describe un sistema de análisis de un sistema indicador que muestra un miARN que proporciona un método de medición de la atenuación génica de un gen analizado sin problemas. El sistema se utiliza para determinar si los ARNips y los ARNs quiméricos pueden disminuir la expresión del gen luciferasa analizado sin problemas.

40 La Solicitud de la patente de Estados Unidos 20050266552 describe la construcción de un constructo indicador apropiado para la introducción en células de mamíferos para crear líneas celulares que pueden utilizarse para la identificación de genes implicados en las vías de represión de la traducción de miARN y/o en moduladores químicos de dichas vías.

45 Mansfield JH *et al* (2004) *Nat Genet* 36(10):1079-83 Epub, fe de erratas en *Nat Genet* (2004) 36(11):1238; y Brennecke J *et al* (2005) *PLoS Biol* 3(3):e85 describen plásmidos que contienen un gen indicador con secuencias diana de miARN. En los dos informes, los constructos se concibieron para controlar la expresión de los miARNs endógenos y no con el fin de regular un transgén y/o restringir la expresión en tipos celulares particulares.

50 Una importante característica de la presente invención que habría que destacar es que se describe cómo pueden concebirse los vectores a regular mediante miARNs endógenos para controlar la expresión transgénica para obtener los perfiles de expresión específicos del vector. Aunque ya existen informes que demuestran que las secuencias diana de miARN pueden incluirse en un constructo indicador (un plásmido que expresa un gen marcador tal como luciferasa) para seguir la expresión de un miARN, estos no describen la explotación de miARN específicamente para la regulación del vector. En particular, no describen el uso de los vectores de la presente invención para los enfoques con terapia génica que evitan el rechazo mediado por el sistema inmunitario de un transgén de interés o fabrican enfoques para aumentar el título de partículas virales que expresan genes tóxicos que son generalmente tóxicos para la célula en la que se produce la partícula viral.

55

Declaraciones de la invención

5 En el presente documento se describe un vector de transferencia génica apropiado para enfoques de ingeniería genética, tales como terapia génica, transferencia génica y/o regulación de la expresión de un transgén que comprende una secuencia diana de miARN. El miARN se "une operativamente" al transgén. El término "operativamente unido" significa que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera prevista.

10 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un vector génico para su uso en terapia que comprende una secuencia diana de miARN y un transgén operativamente unido a dicha secuencia diana de miARN, en el que la secuencia diana de miARN sirve para prevenir o reducir la expresión del transgén en una célula que comprende un miARN endógeno correspondiente.

15 En una realización, el vector es una partícula de vector viral que comprende una secuencia diana de miARN.

En una realización, la partícula comprende el genoma (ADN o ARN) de la partícula de vector, cuyo genoma comprende la secuencia diana de miARN.

20 En una realización, la partícula comprende el genoma de la partícula de vector, cuyo genoma de ARN comprende la secuencia diana de miARN.

En una realización, la partícula comprende el genoma de ARN de la partícula de vector, cuyo genoma de ARN comprende múltiples secuencias diana de miARN, que pueden encontrarse en tándem.

25 En una realización, la partícula comprende el genoma de ARN de la partícula de vector, cuyo genoma de ARN comprende múltiples secuencias diana de miARN diferentes, que pueden encontrarse en tándem.

30 Más de una copia de una secuencia diana de miARN incluida en el vector puede aumentar la eficacia del sistema. Se visualiza asimismo que podrían incluirse secuencias diana de miARN diferentes. Por ejemplo, los vectores que expresan más de un transgén pueden mantener el transgén controlado en más de una secuencia diana de miARN, que puede ser o no diferente. Las secuencias diana de miARN pueden encontrarse en tándem, aunque se conciben otras disposiciones, como el uso de orientaciones antisentido. Las orientaciones antisentido pueden ser útiles en la producción de partículas virales para evitar la expresión de productos génicos que, de lo contrario, pueden ser tóxicos para las células productoras.

35 En otra realización, la partícula comprende el genoma de la partícula de vector, cuyo genoma de ARN comprende un transgén.

40 Preferentemente, la partícula se obtiene a partir de un lentivirus.

En otra realización, el vector de transferencia génica se encuentra en forma de un vector de transferencia génica no viral. En la presente realización, el vector de transferencia génica puede comprender, o encontrarse en forma de, un vector o plásmido de expresión que comprende la secuencia diana de miARN y opcionalmente un transgén.

45 Como se describe en el presente documento, los vectores de expresión comprenden regiones de ácido nucleico que contienen secuencias que pueden transcribirse. Por consiguiente, se incluyen dentro de esta definición las secuencias codificantes de ARNm, ARNt y ARNr.

50 El vector génico o vector de transferencia génica de la presente invención puede utilizarse para administrar un transgén a un sitio o célula de interés. El vector de la presente invención puede administrarse a un sitio diana mediante un vector viral o no viral.

55 Un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro. A modo de ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de ADN recombinado permiten transferir entidades, tales como un segmento de ADN (tal como un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo), a una célula diana. De manera opcional, una vez dentro de la célula diana, el vector puede utilizarse para mantener el ADN heterólogo en la célula o puede actuar como una unidad de replicación de ADN. Ejemplos de vectores utilizados en técnicas de ADN recombinado incluyen plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales o virus.

60 Los sistemas de administración no virales incluyen, entre otros, métodos de transfección de ADN. En este caso, la transfección incluye un proceso que utiliza un vector no viral para administrar un gen a una célula diana de mamífero.

65 Los métodos de transfección normales incluyen electroporación, biobalística de ADN, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ADN compactado, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfífilos faciales

catiónicos (CFAs) mediados por agentes catiónicos (*Nature biotechnology* 1996 14; 556), y combinaciones de los mismos.

5 Los sistemas de administración viral incluyen, entre otros, un vector de adenovirus, un vector viral adeno-asociado (AAV), un vector viral de herpes, un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector baculoviral. Otros ejemplos de vectores incluyen sistemas de administración *ex vivo* que incluyen, entre otros, métodos de transfección de ADN tales como electroporación, biobalística de ADN, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ADN compactado.

10 El término "partícula de vector" se refiere al vector retroviral encapsidado, que puede unirse preferentemente a y entrar en células diana. Los componentes de la partícula, como ya se ha señalado para el vector, pueden modificarse con respecto al retrovirus de tipo natural. Por ejemplo, las proteínas Env en la cubierta proteica de la partícula pueden modificarse genéticamente para alterar su especificidad de orientación selectiva o lograr alguna otra función deseada.

15 Preferentemente, el vector viral transduce preferentemente un cierto tipo celular o tipos celulares.

Más preferentemente, el vector viral es un vector dirigido, es decir, presenta un tropismo tisular que se altera en comparación con el virus nativo, de modo que el vector se orienta selectivamente a células particulares.

20 En otra realización, la partícula que comprende que la secuencia diana es aquella dirigida por los miARN mir-142as (también llamado hsa-mir-142-3p), let-7a, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-19, mir-142-5p, mir-145, mir-218.

25 Se describe además en el presente documento un conjunto de constructos de ADN para la producción de la partícula de vector viral que comprende un constructo de ADN codificante de un genoma del vector de encapsidación que comprende una secuencia diana de miARN, y un transgén. Por genoma del vector de encapsidación se refiere a que el genoma del vector se encuentra en un entorno en el que puede encapsidarse en una partícula de vector viral. En general requiere los genes presentes de Gag-Pol y Env.

30 Se describe además en el presente documento un proceso para la preparación de una partícula de vector viral que comprende introducir el conjunto de constructos de ADN de la reivindicación en una célula huésped, y obtener la partícula de vector viral.

35 Se describe además en el presente documento una partícula de vector viral producida por el proceso de la presente invención.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector génico o partícula de vector según la presente invención junto con un diluyente, excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable.

40 Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula infectada o transducida con la partícula de vector de la presente invención. En una realización, la célula comprende el miARN correspondiente. La célula puede transducirse o infectarse en un escenario *in vivo* o *in vitro*. La célula puede obtenerse a partir de o formar parte de un animal, preferentemente un mamífero, tal como un humano o un ratón. Por consiguiente, ha de reconocerse que la presente invención es útil para proporcionar animales transgénicos, p. ej., para su uso como modelos de enfermedad. En una realización, el mamífero es un mamífero no humano.

50 Los enfoques actuales para el control de vectores de transcripción dependen fundamentalmente de la administración de elementos potenciadores-promotores obtenidos de genes endógenos (Thomas *et al.*, 2003; Verma y Weitzman, 2005). El uso de estos enfoques, la reconstitución de patrones de expresión génica altamente específicos, como se requiere a menudo en las aplicaciones de terapia y transferencia génica, se limita por el sistema de administración, la capacidad del vector, y los efectos posicionales por inserción (para la integración de vectores). Desarrollando nuevos vectores que hacen uso de miARN expresados de forma endógena para su regulación, los inventores han añadido una capa de control a los vectores que no existía previamente. Este nuevo enfoque permite la represión específica de la expresión génica en los tipos celulares y linajes seleccionados.

55 Con este sistema se puede alcanzar un control mucho más riguroso de la expresión transgénica que es posible actualmente con las tecnologías existentes.

60 Cuando se aplica a vectores de integración, puede eludirse los problemas de desregulación transgénica, que pueden producirse como resultado de los efectos de posición insercional (integración junto a secuencias promotoras/potenciadoras sólidas que anulan el control transcripcional del vector-promotor interno) y permiten patrones altamente específicos de células de la expresión transgénica.

65

Algunas ventajas clave adicionales de la invención

5 Los vectores, tales como virales que incluyen vectores lentivirales, para la expresión transgénica de la transferencia y la terapia génica pueden desarrollarse por ingeniería genética con una secuencia diana de miARN con el fin de reconocerse por miARNs endógenos específicos de tipo celular, regulando, por consiguiente, la expresión transgénica en un subconjunto de células. Además, pueden utilizarse las combinaciones de las secuencias diana de miARN para obtener vectores con patrones de expresión celular altamente específicos.

10 Los inventores demuestran esto con 9 miARNs diferentes, incluyendo let-7a, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-19, mir-142-3p, mir-142-5p, mir-145 y mir-218. Muestran que la concentración de un miARN dentro de una célula puede utilizarse para predecir el perfil de expresión de un vector. Por consiguiente, el método descrito por la presente patente proporciona un método simple para el diseño de vectores con patrones de expresión celular altamente específicos.

15 Pueden considerarse numerosos usos de la presente invención.

20 De hecho, como ejemplo, los inventores han demostrado que la expresión transgénica de un promotor expresado ubicuamente puede evitarse precisamente en una línea celular hematopoyética utilizando un vector que muestra la secuencia diana de mir-142-3p en la región 3'UTR del transgén, como se muestra a continuación en la figura, ya que miR-142-3p presenta un patrón de expresión específico de tipo celular en los tejidos hematopoyéticos. De este modo, este sistema no reduce la expresión transgénica en otros tipos celulares.

25 Los inventores también demuestran que al incorporar una secuencia diana de mir-19a en el vector, la expresión transgénica puede suprimirse en las células productoras 293T, que expresan mir-19a a niveles elevados, y esto no afecta negativamente a la producción del vector. Esta estrategia proporciona un medio importante y hasta la fecha no disponible para producir vectores de alto título que transportan un transgén tóxico.

30 Un uso adicional de la presente invención es el diseño de un sistema de vector que expresa dos transgenes con distintos perfiles de expresión. Los inventores demuestran esto mediante la incorporación de una secuencia diana de mir-142-3p en uno de los dos genes de un vector lentiviral bidireccional. En células renales se expresan ambos transgenes puesto que mir-142-3p no está presente. No obstante, en células hematopoyéticas, solo se expresa uno de los dos transgenes. Este constructo proporciona un estudio demostrativo preliminar cuya regulación de miARN puede utilizarse para regular de forma divergente dos transgenes a partir de un único constructo de vector. Los usos de este diseño de vector incluyen situaciones en las que se transducirá una población heterogénea de células, y para ello se requiere la expresión del gen 1 en uno de los tipos celulares presentes, y la expresión del gen 2 se requiere en otro tipo celular. Este diseño podría utilizarse en aplicaciones terapéuticas que requieren la selección tanto negativa como positiva de células particulares.

40 Los inventores muestran que la transferencia de una secuencia diana de miARN en una célula, incluso a alta copia, no perturba la actividad o expresión natural del miARN endógeno, que se orienta selectivamente a la secuencia del vector.

45 Asimismo, se pueden añadir combinaciones de secuencias diana de miARN para obtener vectores con patrones de expresión celular altamente específicos.

50 El enfoque mediado por miARN para restringir la expresión génica presenta varias ventajas sobre otras estrategias de regulación de transgenes. Hasta la fecha, la mayoría de los esfuerzos para limitar la expresión a partir de células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) se basan en promotores específicos de tejido (Brown *et al.*, 2004b; Follenzi *et al.*, 2004; Mingozi *et al.*, 2003). Aunque este enfoque puede limitar exitosamente la expresión en las células diana, se observa una expresión "parcial" en una fracción de las células no diana. Esto sucede debido al promotor reconstituido, modificado para la inclusión en un sistema de vector, que pierde a menudo parte de su especificidad celular y sucede además debido a que la integración del vector cercano a promotores y potenciadores activos puede activar el promotor específico de tejido e impulsar la expresión transgénica. Debido a que se produce el silenciamiento mediado por miARN a nivel post-transcripcional, la captura del promotor y del potenciador es irrelevante. Como tal, la regulación de miARN puede utilizarse para desorientar selectivamente de forma eficaz la expresión transgénica de un tipo celular particular, mientras permite al mismo tiempo una amplia expresión tisular, como se ha descrito en el presente documento. La regulación de miARN también puede utilizarse como un enfoque complementario para la regulación de un transgén mediante promotores/potenciadores. Incluyendo la secuencia diana de miARN en casetes de expresión ya bajo el control de un promotor específico de tejido, se añade una capa de regulación adicional que eliminará la expresión inespecífica.

65 Según un estudio demostrativo preliminar en el que puede utilizarse miARN para desorientar selectivamente la expresión transgénica de tipos celulares particulares, se desarrolló un LV que puede proporcionar una expresión sólida en hepatocitos y otras células no hematopoyéticas, mientras evita al mismo tiempo la expresión de células hematopoyéticas. Este diseño es particularmente relevante para la terapia génica sistémica en la que la respuesta inmunitaria del huésped contra el transgén limita la eficacia terapéutica (Brown y Lillcrap, 2002). Estudios realizados

en nuestro laboratorio y otros indican que un factor importante contribuye a la inducción de una respuesta inmunitaria específica de transgén después de relacionar la transferencia génica al sitio de expresión transgénica (Brown *et al.*, 2004b; Follenzi *et al.*, 2004). Los vectores que se expresan en APCs del sistema hematopoyético, tales como macrófagos y células dendríticas, se conocen por desencadenar eficazmente respuestas inmunitarias antitransgénicas (De Geest *et al.*, 2003).

En efecto, la administración sistémica de LV, que expresa un transgén bajo el control del promotor CMV, condujo a una alta incidencia de la expresión transgénica en APCs del hígado y el bazo, traducándose en la eliminación mediada por el sistema inmunitario de células que expresan el transgén (Follenzi *et al.*, 2004). En cambio, cuando el promotor CMV se sustituyó con el promotor de la albúmina específico de hígado, se produjo una reducción en la frecuencia y la resistencia de la respuesta inmunitaria. Aunque la incidencia de la inmunidad se redujo mediante el uso del promotor de la albúmina, aún se observó cierto nivel de respuestas inmunitarias. Es probable que ello se deba al bajo nivel de la expresión transgénica en APCs del promotor de la albúmina, como consecuencia de la actividad transcripcional parcial y la captura del promotor/potenciador. Por consiguiente, el problema de la expresión transgénica en las células no diana, causado por eventos que ocurren a nivel de regulación transcripcional, puede superarse utilizando el sistema de miARN de la regulación génica que actúa post-transcripcionalmente. La restricción de la expresión transgénica a un tipo celular particular también puede disminuir la eficacia potencial de la transferencia génica limitando el agregado de células que expresan el transgén.

De este modo, se hipotetiza que la regulación de miARN, que desorienta selectivamente en lugar de orientar selectivamente la expresión génica y las funciones a nivel post-transcripcional, puede proporcionar un medio único para superar las limitaciones de los sistemas de administración génica actuales. Al impedir la expresión transgénica en linajes hematopoyéticos, mientras permite al mismo tiempo altos niveles de expresión en células no hematopoyéticas, se señaló que la regulación de miARN podría permitir una transferencia génica fuerte y estable en ausencia de una respuesta inmunitaria.

Se modificó un LV preexistente, que contiene el indicador de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo control transcripcional del promotor PGK expresado ubicuamente, para incluir la secuencia diana de un miARN conocida por expresarse en las células de origen hematopoyético. Después de la administración sistémica del vector de nuestro LV regulado por miARN, la expresión génica se detectó casi exclusivamente en hepatocitos y células endoteliales del hígado. La expresión en células de Kupffer, y en macrófagos residentes hepáticos, era prácticamente indetectable. Estos eran resultados en marcado contraste con la administración de un LV que no contenía la secuencia diana de miARN, en los que la mayoría de la expresión transgénica se produjo en células de Kupffer.

En un experimento posterior, en el que los vectores se inyectaron en ratones Balb/c inmunocompetentes, durante dos semanas posterior a la inyección no se observó ninguna célula positiva para GFP en el hígado de ratones tratados con LV.PGK.GFP. En contraposición, los ratones tratados con LV.PGK.GFP.142-3pT presentaron una frecuencia significativa de hepatocitos positivos para GFP 2 semanas tras la administración del vector. Además, se descubrió que la expresión de GFP persiste durante más de 120 días posteriores a la inyección (el último intervalo de tiempo analizado). Del mismo modo, la estrategia de regulación por miARN también fue eficaz para prevenir una respuesta inmunitaria en un antígeno circulante. Específicamente, se trataron ratones con hemofilia B con un vector lentiviral que expresa Factor IX humano (hFIX), y se halló que cuando se incluyó la secuencia de mir-142-3pT en el vector, la expresión de hFIX se mantuvo estable, mientras que en ratones tratados con un vector similar sin la secuencia de mir-142-3pT, la expresión de hFIX no se detectó tras 3 semanas posteriores a la inyección.

Estos resultados proporcionan la primera demostración que el miARN puede utilizarse para reorientar selectivamente la expresión de un vector viral, y da lugar a un tratamiento prolongado para una enfermedad. También estos proporcionan pruebas que la regulación de miARN del vector puede reducir la respuesta inmunitaria antitransgénica. Este LV regulado por miARN, el primero de su tipo, tendrá importantes implicaciones en la terapia génica dirigida al hígado, en la que la expresión génica en las células hematopoyéticas puede ser perjudicial para objetivos terapéuticos. Por tanto, la presente invención puede emplearse para prevenir el rechazo mediado por el sistema inmunitario del gen transferido.

Tras la administración *in vivo* del vector, la presente invención evitará la expresión del vector en las células presentadoras de antígeno del sistema inmunitario, que son parte del sistema hematopoyético, y de ese modo se previene el inicio de una respuesta inmunitaria contra el transgén. Posiblemente, cuando se aplica a un promotor específico de tejido que orienta selectivamente la expresión a hepatocitos, se permitiría suprimir la expresión ectópica en una APC transducida. Ello podría resolver un obstáculo importante y un problema existente desde hace tiempo en la transferencia génica; concretamente, el rechazo mediado por el sistema inmunitario del gen transferido.

Otros aspectos particulares y preferentes de la presente invención se exponen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características de las reivindicaciones dependientes pueden combinarse con las características de las reivindicaciones independientes, según proceda, y en combinaciones distintas de las expuestas explícitamente en las reivindicaciones.

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se especifique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinado e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto en la materia. Dichas técnicas se explican en la literatura. Véanse, 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 y Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley y 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; 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; *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol n.º 1* de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); *Antibodies: A Laboratory Manual* de Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855. *Handbook of Drug Screening*, editado por Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, Nueva York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); y *Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench*, editado por Jane Roskams y Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3. Cada uno de estos textos generales se incorpora en el presente documento por referencia.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá adicionalmente, a modo de único ejemplo, con referencia a sus realizaciones preferentes como se ilustra en los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1a. Representación esquemática de un sistema de vector lentiviral regulado por miARN. En este caso se muestra el vector lentiviral original codificante de la proteína verde fluorescente potenciada (eGFP) bajo el control transcripcional del promotor PGK humano expresado ubicuamente (LV.PGK.GFP), y un vector modificado, que contiene 4 copias en tándem de una secuencia orientada selectivamente por un miARN endógeno (LV.PGK.GFP.mirT).

Figura 1b. Representación esquemática de un sistema de vector lentiviral regulado de manera divergente que utiliza la regulación de miARN. En este caso se muestra el vector lentiviral bidireccional original codificante de la eGFP y el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso (Δ LNGFR) mutado bajo el control transcripcional de un constructo promotor bidireccional (Bd.LV), que permite coordinar la transcripción de dos transgenes como transcritos distintos. Se modificaron Bd.LVs para incluir secuencias de mirT en la región no traducida 3' (3'UTR) del casete de expresión de eGFP.

Figura 1c. Representación esquemática de un sistema de vector lentiviral regulado por miARN específico de hepatocitos. En este caso se muestra el vector lentiviral original codificante del factor IX de coagulación humano (hFIX) bajo el control transcripcional de un elemento sintético del promotor/potenciador específico de hígado. (LV.ET.hFIX), y un vector modificado, que contiene 4 copias en tándem de una secuencia orientada selectivamente por un miARN endógeno (LV.ET.hFIX.mirT).

Figura 2a. Análisis de perfil de miARN. Análisis de la expresión de miARNs seleccionados en las células 293T y U937 por PCR en tiempo real. Los niveles de expresión se indican en relación con let-7a, un miARN "de mantenimiento" expresado de forma constitutiva.

Figura 2b. La regulación de miARN puede utilizarse para desorientar selectivamente la expresión de linajes hematopoyéticos. El análisis por FACS de las células 293T (origen renal), U937 (origen monocitario) y dendríticas primarias (derivadas de la sangre periférica) se transdujo con concentraciones similares a la dosis de LV indicada a los 14 días posteriores a la transducción. Un LV que contiene un promotor de la albúmina específico de hígado (LV.ALB.GFP), se muestra para comparar la actividad inespecífica de este promotor. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes. Las copias de vector por genoma (C/G) se determinaron por el análisis de Taqman. En gris se muestran las células no transducidas.

Figura 2c. La regulación de miARN puede explotarse para construir un vector para la regulación divergente de dos transgenes. El análisis por FACS de la expresión de GFP y Δ LNGFR de células 293T y U937 se transdujo con concentraciones estrechamente similares de Bd.LV que expresa GFP, con o sin mir-142-3pT y Δ LNGFR, 14 días posteriores a la transducción. Los diagramas de puntos son representativos de dos experimentos independientes.

Figura 2d. El diseño del vector regulado por miARN puede utilizarse para construir numerosos vectores que se regulan por diferentes miARNs endógenos, y median diversos perfiles de expresión del vector. El análisis por FACS de la expresión de GFP y Δ LNGFR de las células 293T y U937 se transdujo con concentraciones estrechamente similares de Bd.LV que expresa GFP, con o sin las secuencias mirT indicadas, y Δ LNGFR, a los 14 días posteriores a la transducción.

Figura 3a. El análisis en RT-PCR cuantitativa de la expresión de GFP de las células 293T y U937 se transdujo por LV.PGK.GFP o LV.PGK.GFP.142-3pT. El ADNc de las células se presenta en la Figura 1b. Todas las muestras se normalizaron con la expresión de GAPDH y los valores se indican en relación a los transcritos detectados de las células 293T transducidas con 10^5 UT/ml de LV.PGK.GFP, establecido como el calibrador.

5 Figura 3b. El análisis en RT-PCR cuantitativa de la expresión de GFP y Δ LNGFR de las células U937 se transdujo por el Bd.LV indicado. El ADNc se recogió de las células presentadas en la Figura 1c. Todos los valores se indicaron en relación al nivel de los transcritos de Δ LNGFR detectados en las células transducidas con 10^5 UT/ml de Bd.LV.

10 Figura 3c. Análisis de la membrana de Northern de las células transducidas por LV y BDd.LV con o sin mir-142-3pT (se muestra en la Figura 1b y 1c, respectivamente). Se cargaron veinte microgramos de ARN total para cada muestra y se hibridan para GFP. El tamaño esperado del transcrito se indica con flechas para el LV (parte superior) y Bd.LV (parte inferior).

15 Figura 3d. Células U937 infectadas repetidamente con LV.PGK.GFP.142-3pT para obtener un aumento del contenido de vector. Se midió GFP mediante el análisis por FACS. Se indica la media del vector C/G para la población celular. Se incluye un análisis de regresión que muestra la relación entre el aumento de la dosis del vector y la expresión del transgén para LV.PGK.GFP.142-3pT (derecha). Tenga en cuenta que en las células U937 una sola copia de LV.PGK.GFP (panel inferior izquierdo) expresa GFP a niveles más altos que 175 C/G de LV.PGK.GFP.142-3pT.

20

Figura 3e. La robustez de la interferencia por ARN mediado por mir-142-3p se midió mediante la superinfección de las células U937 que contienen 4 C/G de LV.PGK.GFP.mir-142-3pT con concentraciones crecientes de LV.PGK. Δ LNGFR.mir-142-3pT. Se utilizó el análisis de Taqman para detectar el número de copias del vector de las células superinfectadas, y se midieron los cambios en la expresión de GFP y Δ LNGFR mediante análisis por FACS.

25

Figura 4. La regulación por miARN puede explotarse para evitar la expresión transgénica en las células productoras sin reducir el título del vector. Se compararon la expresión transgénica y el título de producción de tres constructos diferentes de vector lentiviral. Los histogramas muestran la expresión de GFP en células 293T durante la producción del vector. Los diagramas de puntos presentan la expresión de GFP en células 293T después de la transducción con los vectores producidos. Los constructos pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas y pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas presentan los casetes de expresión en orientación antisentido. Como se muestra, cuando el casete de expresión se coloca en antisentido (pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas) existe una reducción de hasta un múltiplo de 10 en el título del vector cuando se compara con el vector pLV.PGK.GFP canónico. Sin embargo, la inclusión de la secuencia de mir-19aT en el casete de expresión antisentido restaura el título al del constructo canónico.

30

35

Figura 5a. Los vectores regulados por miARN pueden concebirse para lograr desorientar selectivamente la expresión de un linaje celular particular *in vivo*. Análisis de microscopía confocal del hígado de ratones desnudos inyectados con LV indicado en la vena de la cola 2 semanas antes. Las imágenes son representativas de 3 ratones. Se visualizó GFP por fluorescencia directa. Se inmunotñieron secciones del hígado para el marcador F4/80 específico de macrófagos (izquierda) y para el marcador de células endoteliales CD31 (derecha). Prácticamente ninguna de las células de Kupffer F4/80+ expresó GFP a niveles detectables cuando se utilizó el vector de mir-142-3pT, mientras que muchas de estas células expresaban GFP cuando se transducían por los otros vectores. Tenga en cuenta que las células endoteliales sinusoidales hepáticas CD31+ expresaron GFP tras la transducción por todos los vectores, incluyendo LV.PGK.GFP.142-3pT (flechas).

40

45

Figura 5b. Los vectores regulados por miARN pueden concebirse para lograr desorientar selectivamente la expresión de un linaje celular particular *in vivo*. Se inmunotñieron secciones del bazo de los mismos ratones indicados previamente para el marcador CD45 pan-leucocitario. LV.PGK.GFP.142-5pT desorientó eficazmente la expresión de GFP de los leucocitos CD45+, pero permitió una fuerte expresión de GFP en las células estromales no hematopoyéticas (CD45-negativo) de la zona marginal sinusal.

50

Figura 5c. Los vectores lentivirales regulados por miARN pueden concebirse para evitar la expresión transgénica en células hematopoyéticas tras la inyección intravenosa del vector. Análisis por FACS de la expresión de GFP de esplenocitos de animales tratados con LV.PGK.GFP y LV.PGK.GFP.142-3pT.

55

Figura 6a. Los vectores regulados por miARN pueden concebirse para evitar la expresión transgénica en células de linaje hematopoyético *in vivo*, incluso a alta copia del vector. El análisis por FACS de la expresión de GFP en la sangre periférica y la médula ósea de ratones transgénicos representativos de TgN.PGK.GFP.142-3pT (24 C/G) y TgN.PGK.GFP (4 C/G) muestra una expresión transgénica prácticamente indetectable a pesar del elevado número de copias del vector transportadas por estos ratones.

60

Figura 6b. Los vectores regulados por miARN pueden concebirse para segregar la expresión génica entre los linajes hematopoyéticos y no hematopoyéticos de ratones transgénicos. Inmunofluorescencia de los órganos indicados de los ratones previos. Se visualizó GFP por fluorescencia directa. Las células de linaje hematopoyético se marcaron

65

por inmunotinción de CD45 en todos los órganos analizados excepto en el timo, en el que se utilizó CD3 para marcar los timocitos. En ratones con TgN.PGK.GFP, se detectó la expresión de GFP pan-celular en el parénquima y estroma de todos los órganos. Las células de linaje hematopoyético aparecen de color amarillo debido a la superposición entre la tinción de CD45 y la expresión de GFP. En cambio, la expresión de GFP en ratones transgénicos con PGK.GFP.142-3pT se suprimió selectivamente en las células de Kupffer CD45+ (hígado), en el macrófago alveolar (pulmón) y de la lámina propia (intestino), que aparecen de color rojo y se indican con flechas. En el bazo y el timo, la expresión de GFP también era negativa en todas las células de linaje hematopoyético, a pesar de una fuerte expresión en el estroma de estos órganos.

Figura 7a. El LV regulado por miARN permite la transferencia génica estable en ratones inmunocompetentes. Se administró el LV indicado por análisis de inmunofluorescencia confocal en las secciones del hígado y bazo de ratones Balb/c. Se visualizó GFP en el hígado por fluorescencia directa; se detectaron las células de Kupffer, los linfocitos T CD8+, o las células endoteliales por tinción con anti-F4/80, anti-CD8, o anti-CD31, respectivamente. Las células GFP+ de ratones con LV.PGK.GFP y LV.ALB.GFP se eliminaron del hígado durante 2 semanas, que se correlacionaban con la presencia de infiltrados de linfocitos T CD8+. Por el contrario, la abundancia de hepatocitos GFP+ y células endoteliales persistió durante >120 días (intervalo de tiempo analizado más duradero) en ratones inyectados con LV.PGK.GFP.142-3pT.

Figura 7b. Las células GFP+ en el hígado de los ratones tratados con LV.PGK.GFP.142-3pT del día 70 presentaban la morfología típica de los hepatocitos o eran células endoteliales CD31+ (flechas). Esto demuestra un aspecto novedoso de este enfoque, que desorienta selectivamente la expresión de un tipo celular particular, mientras permite al mismo tiempo la expresión transgénica en un amplio intervalo de linajes celulares.

Figura 7c. La tinción de hematoxilina y eosina (H y E) muestra histología normal y ausencia de infiltración de células mononucleares en ratones con LV.PGK.GFP.142-3pT a los 42 días posteriores a la inyección.

Figura 7d. Análisis del bazo de ratones inmunocompetentes inyectados con el vector indicado 5 días antes. Se observó principalmente la expresión de GFP del vector de mir-142-3pT en la zona marginal sinusal (MS); algunas de estas células GFP+ expresaron α -actina de músculo liso (α -SML) y se identificaron como células estromales similares a fibroblastos (flechas). Tenga en cuenta que estaban presentes células GFP+ dispersas, incluyendo algunas células hematopoyéticas CD45+, en el bazo de los ratones con LV.ALB.GFP (flecha). Esto demuestra además que la estrategia de regulación por miARN puede proporcionar un medio mejorado de regulación transgénica en promotores específicos de tejido.

Figura 8a. Los vectores lentivirales regulados por miARN median la corrección estable de la hemofilia B en un modelo murino. A los ratones con hemofilia B se les inyectó (inactivación del factor IX) a través de la cola un vector lentiviral de codificación de hFIX bajo el control del promotor ET específico de hepatocitos (LV.ET.hFIX) o un LV.ET.hFIX modificado que contiene la secuencia de mir-142-3pT en la región 3'UTR del transgén (LV.ET.hFIX.142-3pT). La concentración plasmática de antígeno de hFIX se determinó mediante ELISA específico de hFIX (parte superior), mientras que la actividad de coagulación de FIX se determinó midiendo el tiempo de tromboplastina parcial activada (parte inferior). Los resultados se presentan como la media más o menos del error estándar de tres ratones tratados por vector.

La Figura 9A muestra la secuencia horquilla de hsa-mir-142 maduro.

La Figura 9B muestra la secuencia de mir-142 como diana.

MicroARNs (miARNs)

Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN codificadas en los genomas de plantas y animales. Estos ARNs altamente conservados de ~21-mer regulan la expresión de los genes uniéndose a ARNs específicos (He y Hannon, 2004).

Los miARNs son una familia de pequeños ARN no codificantes que regulan la expresión génica de una manera específica en una secuencia.

Resumen de microARNs: ARNs PEQUEÑOS CON UN IMPORTANTE PAPEL EN LA REGULACIÓN GÉNICA, Lin He y Gregory J. Hannon *Nature Reviews Genetics* 5, 522-531 (2004):

- Los microARNs (miARNs) son una familia de pequeños ARNs de ~21-25 nucleótidos que regulan negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional.
- Los miembros fundadores de la familia miARN, *lin-4* y *let-7*, se identificaron a través de exploraciones genéticas para hallar defectos en la regulación temporal del desarrollo larvario de *Caenorhabditis elegans*.
- Debido a los esfuerzos de clonación del genoma completo, hoy en día se han identificado cientos de miARNs en casi todos los metazoos, incluyendo moscas, plantas y mamíferos.

- Los miARNs exhiben patrones de expresión regulada temporal y espacialmente durante diversos procesos de desarrollo y fisiológicos.
- La mayoría de los miARNs de animales caracterizados hasta el momento afectan a la síntesis proteica de sus ARNm diana. Por otra parte, la mayoría de los miARNs vegetales estudiados hasta la fecha dirigen la escisión de sus dianas.
- El grado de complementariedad entre un miARN y su diana, determina, al menos en parte, el mecanismo de regulación.
- En animales, los transcritos primarios de miARNs se procesan de forma secuencial por dos enzimas RNasa III, Drosha y Dicer, en un híbrido pequeño e imperfecto de ARNbc (miARN:miARN*) que contiene tanto la cadena de miARN maduro como su cadena complementaria (ARNm*). La relativa inestabilidad en el extremo 5' del miARN maduro conlleva al ensamblaje asimétrico del miARN maduro en el complejo efector, el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).
- Las proteínas Ago son un componente clave del RISC. Múltiples homólogos de Ago en varios genomas de metazoos indican la existencia de múltiples RISCs que llevan a cabo funciones biológicas relacionadas pero específicas.
- La predicción bioinformática de las dianas de miARN ha proporcionado una importante herramienta para explorar las funciones de los miARNs.

Se han clonado y secuenciado varios cientos de miARNs de ratones, humanos, *Drosophila*, *C. elegans* y *Arabidopsis*. Ejemplos de dichas secuencias pueden hallarse en www.sanger.ac.uk (Griffiths-Jones *et al.*, 2006). Secuencias adicionales de miARN diana pueden buscarse en www.miRNA.org.

Al igual que los ARNm, los perfiles de expresión de miARN parecen variar de tejido a tejido pero uno es similar para tejidos idénticos en diferentes individuos (Baskerville y Bartel, 2005). La determinación de un miARN con el perfil de expresión deseado puede conseguirse utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Una vez identificado el miARN, la secuencia diana correspondiente puede determinarse fácilmente utilizando, por ejemplo, las bases de datos indicadas previamente.

Por ejemplo, el conjunto de sondas miTNA de *mirVana*TM y el kit de etiquetado miTNA de *mirVana*TM disponibles de Ambion, Inc. pueden utilizarse para comparar los perfiles de expresión de miARN en tejidos humanos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Otra forma común de identificar miARNs específicos de tejido es utilizar la membrana de Northern. Un ejemplo de dicha técnica se describe en Lagos-Quintana M *et al*, *Current Biol* (2002) 12:735-739 en el que se identifican 34 nuevos miARNs por clonación específica de tejido de ARNs de aproximadamente 21 nucleótidos de ratón (Lagos-Quintana *et al.*, 2002).

Del mismo modo, Michael M *et al*, *Mol Can Res* (2003) 1:882-891 describe la identificación de 28 secuencias diferentes de miARN en adenocarcinomas de colon y en la mucosa normal.

Chen C-Z *et al*, *Science* (2004) 303:83-86 describe tres miARNs, miR-181, miR-142 y miR-223 que se expresan específicamente en las células hematopoyéticas (Chen *et al.*, 2004).

Sempere L *et al*, *Genome Biology* (2004) 5:R13 desvela un total de 17 miARNs detectados exclusivamente en un órgano particular de ratón; entre estos: siete miARNs específicos en el cerebro (miR-9, -124a, -124b, -135, -153, -183, -219), seis miARNs específicos en el pulmón (miR-18, -19a, -24, -32, -130, -213), dos miARNs específicos en el bazo (miR-189, -212), un miARN específico en el hígado (miR-122a), y un miARN específico en el corazón (miR-208). Todos los miARNs específicos en el cerebro, hígado y corazón de ratón indicados también se detectaron en los órganos de contrapartida humanos (no se evaluó la expresión de miARN en el riñón, pulmón o bazo humano), con la excepción de miR-183 en el cerebro humano. Entre los 75 miARNs que se detectaron en dos o más órganos de ratón, se detectaron niveles de 14 de estos en un órgano particular del ratón a niveles al menos duplicados mayores que en cualquier otro órgano; entre estos: siete miARNs enriquecidos en el cerebro (miR-9*, -125a, -125b, -128, -132, -137, -139), tres miARNs enriquecidos en el músculo esquelético (miR-1d, -133, -206), dos miARNs enriquecidos en el riñón (miR-30b, -30c), y un miARN enriquecido en el bazo (miR-99a). Todos los miARNs enriquecidos en el cerebro y enriquecidos en el músculo esquelético presentaban niveles elevados similares a los órganos de contrapartida humanos. La elevada conservación de la expresión de estos miARNs enriquecidos en órganos y específicos de órgano entre ratón y humano sugiere que estos pueden desempeñar un papel conservado en el establecimiento y/o el mantenimiento de un tipo de célula o tejido de ese órgano en particular (Sempere *et al.*, 2004).

Baskerville y Bartel, *RNA* (2005) 11:241-247 desvela un estudio de perfiles de micromatrices y patrones de expresión de 175 miARNs humanos entre 24 órganos humanos diferentes. Los resultados muestran que los pares proximales de miARNs se coexpresan generalmente (Baskerville y Bartel, 2005). Además, una transición abrupta en la correlación entre pares de miARNs expresados se produce a una distancia de 50 kb, lo que implica que los miARNs separados por <50 kb se obtienen normalmente a partir de un transcrito común. Algunos miARNs están

dentro de los intrones de los genes huésped. Los miARNs intrónicos se expresan por lo general de forma coordinada con su ARNm del gen huésped, lo que implica que también se obtienen en general a partir de un transcrito común, y que pueden utilizarse análisis in situ de la expresión génica del huésped para hibridar la localización espacial y temporal de los miARNs intrónicos.

5 Barad *et al*, *Genome Research* (2004) 14:2486-2494 establece un sistema de micromatrices de oligonucleótidos específicos de miARN que permite el análisis eficiente de la expresión de los miARNs humanos identificados hasta el momento. Esto demuestra que las sondas de oligonucleótidos de 60-mer en las micromatrices se hibridan con ARNc marcado de miARNs, pero no con sus ARNs precursores de horquilla obtenidos a partir de ARN amplificado, fraccionado en clases de tamaño, total de origen humano. La intensidad de la señal se relaciona con la ubicación de las secuencias de miARN en las sondas de 60-mer, ubicadas en la región 5' que proporciona las señales más altas, y en el extremo 3', que proporciona las señales más bajas. Por consiguiente, las sondas de 60-mer que albergan una única copia de miARN en el extremo 5' proporcionaron señales de intensidad similar a las sondas que contienen dos o tres copias de miARN. El análisis de malapareamiento muestra que las mutaciones en la secuencia de miARN reducen o eliminan significativamente la señal, lo que sugiere que las señales observadas reflejan fielmente la abundancia de miARNs equivalentes en el ARNc marcado. El perfil de expresión de 150 miARNs en cinco tejidos humanos y en células HeLa reveló una buena concordancia general con los resultados publicados previamente, aunque también con algunas diferencias. Se presentan los datos en la expresión de miARN en el timo, los testículos, y la placenta, y se han identificado miARNs altamente enriquecidos en estos tejidos. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el aumento de la sensibilidad de la micromatriz de ADN en otros métodos para la detección y el estudio de miARNs, y el inmenso potencial en la aplicación de este tipo de micromatrices para el estudio de miARNs en la salud y la enfermedad (Barad *et al.*, 2004).

25 Kasashima K *et al*, *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 322(2):403-10 describe la identificación de tres miARNs novedosos y 38 conocidos expresados en células de leucemia humanas (HL-60) (Kasashima *et al.*, 2004).

Mansfield J *et al*, *Nature Genetics* (2004) 36:1079-1083 desvela la expresión específica de tejido de varios miARNs durante la embriogénesis, incluyendo miR-10a y miR-196a (Mansfield *et al.*, 2004).

30 Chen C-Z y Lodish H, *Seminars in Immunology* (2005) 17(2):155-165 desvela miR-181, un miARN expresado específicamente en las células B en la médula ósea de ratón (Chen y Lodish, 2005). Se describe además que algunos miARNs humanos se relacionan con leucemias; el locus miR-15a/miR-16 se elimina con frecuencia o se disminuye en pacientes que padecen leucemia linfocítica crónica de células B y miR-142 se encuentra en un sitio de translocación hallado en un caso de leucemia de células B agresiva. Se señala que estos resultados indican que los miARNs pueden ser importantes reguladores de la hematopoyesis en mamíferos.

Los métodos para identificar nuevos miARNs y sus secuencias diana utilizando un enfoque computacional se desvelan en el documento WO2004/066183 y Brennecke J *et al*, *PLoS Biology* (2005) 3(3):0404-0418 (Brennecke *et al.*, 2005).

40 La siguiente tabla 1 resume los miARN que pueden encontrar aplicabilidad en la presente invención.

Tabla 1 Estudios de expresión en miARNs de mamífero		
Patrón de expresión	miARN	Referencias
<i>Patrones de expresión específicos de tejido de miARNs de mamífero</i>		
Célula específica ES	miR-296	a
Expresado en células ES, pero aumentado en la diferenciación	miR-21 y miR-22	a
Expresado tanto en células ES como en varios tejidos adultos	miR-15a, miR-16, miR-19b, miR-92, miR-93 miR-96, miR-130 y miR-130b	a

Enriquecido durante el desarrollo cerebral del ratón	<i>miR-128, miR-19b, miR-9, miR-125b, miR-131 miR-178, miR-124a, miR-266 y miR-103</i>	b,c
Enriquecido en cerebro adulto	<i>miR-9*, miR-125a, miR-125b, miR-128, miR-132 miR-137, miR-139, miR-7, miR-9, miR124a, miR-124b, miR-135, miR-153, miR-149, miR- 183, miR-190, y miR-219</i>	b
Enriquecido en pulmón	<i>miR-18, miR-19a, miR-24, miR-32, miR-130 miR-213, miR-20, miR-141, miR-193 y miR-200b</i>	b
Enriquecido en bazo	<i>miR-99a, miR-127, miR-142-a, miR-142-s, miR-151, miR-189b y miR-212</i>	b
Tejidos hematopoyéticos	<i>miR-181, miR-223 y miR-142</i>	b
Enriquecido en hígado	<i>miR-122a, miR-152, miR-194, miR-199 y miR-215</i>	b
Enriquecido en corazón	<i>miR-1b, miR-1d, miR-133, miR-206, miR-208 y miR-143</i>	b
Enriquecido en riñón	<i>miR-30b, miR-30c, miR-18, miR-20, miR-24 miR-32, miR-141, miR-193 y miR-200b</i>	b
Expresado ubicuamente	<i>miR-16, miR-26a, miR-27a, miR-143a, miR-21 let-7a, miR-7b, miR-30b y miR-30c</i>	b
<u>Expresión de miARN anormal durante la tumorigénesis</u>		
Disminuida en leucemias linfocíticas crónicas	<i>miR-15 y miR-16</i>	d
Disminuida en líneas celulares de cáncer de pulmón	<i>miR-26a y miR-99a</i>	e
Disminuida en cánceres de colon	grupo <i>miR143/miR-145</i>	f
Aumentada en linfoma de Burkitt	<i>miR-155</i>	g
Células ES, células madre embrionarias		
a - Houbavy <i>et al, Dev. Cell</i> (2003) 5:351-358. b - Sempere <i>et al, Genome Biol.</i> (2004) 5, R13. c - Krichevsky <i>et al, RNA</i> (2003), 9:1274-1281. d - Calin <i>et al, Proc Natl Acad Sci</i> (2002) 99:15524-15529. e - Calin <i>et al, Proc Natl Acad Sci</i> (2004) 101:2999-3004. f - Michael <i>et al, Mol Cancer Res</i> (2003) 1:882-891 g - Metzler <i>et al, Genes Chromosomes Cancer</i> (2004) 39:167-169.		

Aunque nuestros datos demuestran la utilidad de este enfoque para restringir la expresión de las células hematopoyéticas, la red de regulación del miARN endógeno permitirá muchas más posibilidades para restringir severamente la expresión transgénica. Los estudios de expresión ya han revelado miARNs específicos para muchos tipos celulares diferentes, incluyendo neuronas, islotes pancreáticos, y tejido adiposo. Utilizando el presente diseño,

podría crearse un vector que incluye secuencias diana de miR-21 y miR-22, dos miARNs aumentados tras la diferenciación de células madre embrionarias (ESCs) (Houbaviy *et al.*, 2003), unidos a un gen suicida tal como la timidina quinasa.

5 Otro uso posible del diseño del vector regulado por miARN sería para el tratamiento contra el cáncer. Varios informes han indicado que los miARNs específicos se reducen en ciertos tumores. miR-15 y miR-45, por ejemplo, disminuyen en leucemias linfocíticas crónicas y en el cáncer de mama (Calin *et al.*, 2004a; Calin *et al.*, 2004b; Iorio *et al.*, 2005). La secuencia diana de miR-15 o miR-145 podría incluirse en un vector que expresa un transgén tóxico. Las células normales que expresan miR-15 o miR-145, incluyendo las células productoras del vector, suprimirían la producción de la toxina y así sobrevivir, mientras que las células tumorales transducidas, que ya no expresan miR-15 o miR-145, podrían producir fácilmente el gen de la toxina y morir.

Otro uso posible del diseño del vector regulado por miARN impediría la movilización del vector de las células hematopoyéticas transducidas que se superinfectan con un virus de tipo natural. La secuencia diana de miARN también podría incluirse en una región del vector distinta de la casete de expresión para el transgén.

El vector de miARN puede utilizarse en conjunción con un promotor bidireccional (Amendola *et al.*, 2005). Estos vectores, que presentan la propiedad única de producir dos transcritos de ARNm distintos de un único promotor, pueden modificarse para incluir secuencias diana de miARN en uno o ambos de los casetes de expresión. Por consiguiente, la adición de miR-142-3pT al transgén 1, pero no al transgén 2, permitiría la expresión ubicua del transgén 2, mientras previene al mismo tiempo la expresión de transgén 1 en células hematopoyéticas. Este diseño permitirá la regulación divergente de dos transgenes, una característica no posible con las tecnologías actuales.

El miARN puede utilizarse con un vector génico apropiado, es decir, un vector adecuado para la administración de un gen (transgén) de interés, tal como un vector viral. Ejemplos de estos se describen a continuación.

Retrovirus

30 Durante la última década, la terapia génica se ha aplicado al tratamiento de la enfermedad en cientos de ensayos clínicos. Se han desarrollado varias herramientas para administrar genes en células humanas; entre ellos, los retrovirus modificados genéticamente, incluyendo lentivirus, se encuentran actualmente entre la herramienta más popular para la administración de genes. La mayoría de los sistemas contienen vectores que son capaces de acomodar genes de células de interés y células auxiliares que pueden proporcionar las proteínas y las enzimas estructurales virales para permitir la generación de partículas virales infecciosas que contienen el vector. Los retrovirus son una familia de retrovirus que difiere en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, la estructura genómica, la patogenicidad, y el rango de huésped. Esta diversidad proporciona oportunidades para utilizar virus con diferentes características biológicas para desarrollar diferentes aplicaciones terapéuticas. Como con cualquier herramienta de administración, la eficacia, la capacidad para orientarse selectivamente a cierto tejido o tipo celular, la expresión del gen de interés, y la seguridad de los sistemas basados en retrovirus son importantes para la aplicación exitosa de la terapia génica. En los últimos años se han dedicado importantes esfuerzos a estas áreas de investigación. Se han realizado diversas modificaciones a los vectores basados en retrovirus y en células auxiliares para alterar la expresión génica, la administración diana, mejorar los títulos virales, y aumentar la seguridad. La presente invención representa una mejora en este proceso de diseño que actúa para administrar eficazmente genes de interés en dichos vectores virales.

45 Los virus son herramientas lógicas para la administración génica. Se replican dentro de las células y, por tanto, presentan mecanismos evolucionados para entrar en las células y utilizan la maquinaria celular para expresar sus genes. El concepto de la administración génica basado en virus es desarrollar por ingeniería genética el virus para que pueda expresar el gen de interés. En función de la aplicación específica y el tipo de virus, la mayoría de los vectores virales contienen mutaciones que dificultan su capacidad para replicarse libremente como virus de tipo natural en el huésped.

Se han modificado virus de varias familias diferentes para generar vectores virales para la administración génica. Estos virus incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes simple, picornavirus y alfavirus. La presente invención emplea preferentemente retrovirus, incluyendo lentivirus.

Un vector retroviral ideal para la administración génica debe ser eficiente, específico para las células, regulado y seguro. La eficacia de la administración es importante puesto que puede determinar la eficacia de la terapia. Los esfuerzos actuales se orientan a la consecución de la infección específica de tipo celular y la expresión génica con vectores retrovirales. Además, se están desarrollando vectores retrovirales para regular la expresión del gen de interés, ya que la terapia puede requerir una expresión de larga duración o regulada. La seguridad es un tema importante para la administración de genes virales puesto que la mayoría de los virus son o patógenos o tienen un potencial patogénico. Es importante que durante la administración génica, el paciente no reciba también de manera inadvertida un virus patógeno con potencial de replicación completo.

65

Los retrovirus son virus de ARN que se replican a través de un intermedio de ADN integrado. Las partículas retrovirales encapsidan dos copias del ARN viral completo, cada copia contiene la información genética completa necesaria para la replicación del virus. Los retrovirus poseen una envoltura lipídica y utilizan interacciones entre la proteína de la envoltura viralmente codificada que se incrusta en la membrana y un receptor celular para entrar en las células huésped. Utilizando la transcriptasa inversa de la enzima viralmente codificada, que está presente en el virión, el ARN viral se transcribe de forma inversa en una copia de ADN. Esta copia de ADN se integra en el genoma huésped mediante la integrasa, otra enzima viralmente codificada. El ADN viral integrado se refiere como un provirus y una parte del genoma del huésped se vuelve permanente. La maquinaria transcripcional y traduccional celular lleva a cabo la expresión de los genes virales. La ARN polimerasa II huésped transcribe el provirus para generar ARN, y otros procesos celulares modifican y transportan el ARN fuera del núcleo. Una fracción de ARNs virales se corta y empalma para permitir la expresión de algunos genes, mientras que otros ARNs virales permanecen completos. La maquinaria traduccional huésped sintetiza y modifica las proteínas virales. Las proteínas virales recientemente sintetizadas y los ARNs virales completos recientemente sintetizados se ensamblan entre sí para formar nuevos virus que brotan de las células huésped.

En base a sus estructuras genómicas, los retrovirus pueden clasificarse en retrovirus simples y complejos. Los retrovirus simples y complejos codifican los genes gag (antígeno específico de grupo), pro (proteasa), pol (polimerasa), y env (envoltura). Además de estos genes, los retrovirus complejos también codifican varios genes accesorios.

Los retrovirus también pueden clasificarse en oncovirus, lentivirus, y espumavirus. La mayoría de los oncovirus son retrovirus simples. Los lentivirus, espumavirus, y algunos oncovirus son retrovirus complejos. Actualmente, los tres tipos de virus están siendo explotados como herramientas de terapia génica. A continuación se discutirán ejemplos de cada tipo.

El virus de leucemia murina (MLV) es un ejemplo de oncovirus, el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1) es un ejemplo de lentivirus, y el virus espumoso humano es un ejemplo de espumavirus.

Cuando un retrovirus competente para la replicación infecta una célula huésped natural, puede formar un provirus en el genoma huésped, expresar genes virales, y liberar nuevas partículas infecciosas para infectar otros huéspedes. En la mayoría de las aplicaciones de terapia génica, no es deseable administrar un virus competente para la replicación a un paciente debido a que el virus puede propagarse más allá del tejido dirigido y causar efectos adversos patógenos. Por consiguiente, en la mayoría de sistemas retrovirales diseñados para la administración génica, los componentes virales se dividen en un vector y un constructo auxiliar que limita la capacidad del virus para replicarse libremente.

El término vector se refiere generalmente a un virus modificado que contiene el(los) gen(es) de interés (o transgén) y elementos que actúan en cis necesarios para la expresión y la replicación génica. La mayoría de los vectores contienen una delección(es) de algunas o todas las secuencias codificantes de las proteínas virales de modo que no son competentes para la replicación. Los constructos auxiliares se conciben para expresar genes virales que carecen de los vectores y apoyar la replicación de los vectores. La función auxiliar proporciona más a menudo un formato celular auxiliar aunque también puede proporcionarse como un virus auxiliar o como plásmidos cotransfectados.

Las células auxiliares son células de cultivo desarrolladas por ingeniería genética que expresan proteínas virales necesarias para propagar vectores retrovirales; esto se consigue generalmente mediante la transfección de plásmidos que expresan las proteínas virales en las células de cultivo. La mayoría de líneas celulares auxiliares se obtienen a partir de clones celulares para garantizar la uniformidad en el apoyo a la replicación del vector retroviral. Los virus auxiliares no se utilizan a menudo debido a la probabilidad que podría generarse un virus competente para la replicación a través de la recombinación de alta frecuencia. Las funciones auxiliares también pueden proporcionarse por transfección transitoria de los constructos auxiliares para lograr una rápida propagación de los vectores retrovirales.

La mayoría de los vectores retrovirales se mantienen como plásmidos bacterianos para facilitar la manipulación y la propagación del ADN del vector. Estos vectores de ADN bicatenario pueden introducirse en células auxiliares por métodos convencionales tales como transfección de ADN, lipofección, o electroporación. La célula auxiliar mostrada expresa todas las proteínas virales (Gag, Gag-Pol, y Env), pero carece de ARN que contiene la señal de encapsidación. El ARN viral es necesario para la formación y liberación de partículas virales infecciosas, pero no es necesario para la formación de partículas virales no infecciosas "vacías". Cuando se introduce el ADN vector en las células auxiliares, el ARN vector que contiene una señal de encapsidación se transcribe y se encapsida eficazmente en partículas virales. Las partículas virales contienen proteínas virales expresadas a partir de constructos auxiliares y ARN transcrito a partir del vector. Estas partículas virales pueden infectar células diana, transcribir de forma inversa el vector de ARN para formar una copia de ADN bicatenario, e integrar la copia de ADN en el genoma huésped para formar un provirus. Este provirus codifica el(los) gen(es) de interés, y se expresa por la maquinaria celular huésped. Sin embargo, debido a que el vector no expresa proteínas virales, no puede generar partículas virales infecciosas que pueden propagarse a otras células diana.

Las células auxiliares se conciben para soportar la propagación de vectores retrovirales. Las proteínas virales en las células auxiliares se expresan a partir de constructos auxiliares que se transfectan a células de mamífero. Los constructos auxiliares varían en su modo de expresión y en los genes que codifican.

5 Constructos auxiliares de un genoma

En las líneas celulares auxiliares que se desarrollaron inicialmente, todos los genes virales se expresaron a partir de un constructo auxiliar. Ejemplos de estas células auxiliares son C3A2 y -2. Los constructos auxiliares para estas líneas celulares clonaron ADNs provirales que carecían de las señales de encapsidación. Estas células auxiliares pueden soportar la propagación eficaz de vectores retrovirales. Sin embargo, un problema importante con estas células auxiliares es que los virus competentes para la replicación pueden generarse con frecuencia durante la propagación del vector viral. El constructo auxiliar contiene la mayor parte del genoma viral y por lo tanto comparte homología de secuencia significativa con el vector retroviral. La homología de secuencia puede facilitar la recombinación entre el constructo auxiliar y el vector retroviral para generar virus competentes para la replicación. Aunque el ARN auxiliar carece de la señal de encapsidación, todavía puede encapsidarse en un virión con una baja eficacia (aproximadamente 100 a 1.000 veces menos que contienen ARNs). La recombinación retroviral se produce con frecuencia entre los dos ARNs virales coencapsidados para generar una copia de ADN que contiene la información genética de ambos originales. Si el ARN auxiliar y el ARN vector se encapsidan en el mismo virión, las grandes regiones de homología de secuencia entre los dos ARNs pueden facilitar la recombinación homóloga durante la transcripción inversa para generar un virus competente para la replicación. Un evento de recombinación similar puede producirse entre el ARN auxiliar y el ARN obtenido a partir de un virus endógeno en una menor eficacia para generar virus competentes para la replicación.

25 Constructos auxiliares de genoma fragmentado

El problema de seguridad asociado a la generación de virus competentes para la replicación ha provocado el diseño de muchas líneas celulares auxiliares que utilizan "genomas fragmentados", incluyendo CRIP, GP+envAm12, y DSN. En estas células auxiliares, las poliproteínas virales Gag/Gag-Pol se expresan a partir de un plásmido y las proteínas Env se expresan a partir de otro plásmido. Además, los dos constructos auxiliares también contienen delecciones de elementos virales que actúan en cis para reducir o eliminar homología de secuencia con el vector retroviral. En estas células auxiliares, los genes codificantes de las proteínas virales se separan en dos constructos diferentes y los elementos virales que actúan en cis se encuentran en el vector. Por lo tanto, tienen que producirse varios eventos de recombinación para reconstituir el genoma viral. Además, la reducción de las regiones de homología disminuye la probabilidad que se produzcan estos eventos de recombinación. Por lo tanto, las células auxiliares que contienen constructos auxiliares de genoma fragmentado se consideran más seguros que las células auxiliares que contienen constructos auxiliares de un genoma.

Constructos auxiliares inducibles

40 A diferencia de las líneas celulares auxiliares descritas previamente que expresan las proteínas virales constitutivamente, se han concebido algunas líneas celulares auxiliares para expresar las proteínas virales de una manera inducible. Una de las razones para la generación de una línea celular auxiliar inducible es que algunas proteínas virales son citotóxicas y no pueden expresarse fácilmente a niveles elevados. Utilizando un sistema inducible, la expresión de las proteínas citotóxicas puede limitarse en la etapa en la que se propaga el virus. 45 Controlando la expresión de las proteínas citotóxicas, pueden alcanzarse altos títulos virales. Ejemplos de las células auxiliares inducibles incluyen las células 293GPG y líneas celulares auxiliares de VIH-1.

Sistemas de transfección transitoria

50 Con el desarrollo de métodos de transfección eficientes, también se han desarrollado sistemas de transfección transitoria para la propagación de vectores retrovirales. En estos sistemas, las funciones auxiliares se expresan generalmente a partir de dos constructos diferentes, uno expresa gag-pol y otro expresa env. Estos dos constructos comparten generalmente poca homología de secuencia. El vector retroviral y los constructos auxiliares se transfectan en las células, y los virus se recogen unos pocos días después de la transfección.

55 Sistemas que generan virus pseudotipados

Pseudotipaje se refiere a partículas virales que contienen un genoma viral de un virus y parte (o la totalidad) de las proteínas virales de un virus diferente. La forma más común de pseudotipaje implica un virus que utiliza la proteína de la envoltura de otro virus. Algunas de las líneas celulares auxiliares contienen constructos auxiliares que expresan gag-pol de un virus y env de otro virus. Puesto que las poliproteínas Gag seleccionan el ARN viral, el vector viral que se propaga contiene un ARN reconocido por la poliproteína Gag expresada en estas células. Sin embargo, las partículas virales producidas contienen la proteína Env obtenida a partir de otro virus. Por lo tanto, estas partículas virales solo pueden infectar células que expresan un receptor que puede interactuar con la proteína de la envoltura heteróloga. Por ejemplo, la línea celular auxiliar PG13 expresa gag-pol de MLV y env del virus de la leucemia del mono gibón (GaLV). Debido a que la línea celular PG13 expresa la poliproteína Gag MLV, pueden

encapsidarse eficazmente vectores retrovirales basados en MLV. También se ha demostrado que algunas envolturas obtenidas a partir de virus de una familia diferente también pueden pseudotipar retrovirus y generar partículas virales infecciosas. Por ejemplo, la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), un rabdovirus, puede utilizarse para generar vectores retrovirales pseudotipados. Estos virus pseudotipados G VSV exhiben un rango de huésped muy amplio y pueden infectar a numerosas células que normalmente no pueden infectarse con los retrovirus. Otras envolturas que pueden utilizarse para pseudotipar el vector son las de los siguientes virus: el retrovirus endógeno felino RD114, que se dirige con eficacia a las células hematopoyéticas, el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus de la rabia, los virus del Ébola y Mokola, el virus del río de Ross y el virus del bosque de Semliki, y la envoltura gp64 de baculovirus.

El pseudotipaje puede implicar, por ejemplo, un genoma retroviral basado en un lentivirus tal como un VIH o virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y la proteína de la envoltura puede ser por ejemplo la proteína de la envoltura anfitriónica designada 4070A. Alternativamente, la proteína de la envoltura puede ser una proteína de otro virus tal como una hemaglutinina de la gripe. En otra alternativa, la proteína de la envoltura puede ser una proteína de la envoltura modificada tal como una proteína de la envoltura mutante, troncada o desarrollada por ingeniería genética (como la envoltura RD114 desarrollada por ingeniería genética). Se pueden realizar o seleccionar modificaciones para introducir la capacidad de orientación selectiva o para reducir la toxicidad o para otro fin.

Los sistemas que contienen env genéticamente modificados por célula o interacciones orientadas selectivamente al tejido entre las proteínas de la envoltura viral y los receptores celulares determinan el rango de huésped del virus. Se han desarrollado estrategias para orientar selectivamente la administración del virus en ciertos tipos celulares mediante la modificación de Env viral. Tras la traducción y la modificación, la parte SU de Env interactúa con un receptor celular. La modificación de la parte SU de Env se logra a menudo mediante la delección de una parte de la región codificante de SU y se reemplaza con regiones de otras proteínas. Las proteínas utilizadas para modificar la parte SU de Env incluyen eritropoyetina, heregulina, factor I de crecimiento similar a la insulina, y anticuerpos de fragmentos variables de cadena sencilla contra diversas proteínas.

Sistemas híbridos

Algunos sistemas recientemente desarrollados utilizan un enfoque híbrido para la propagación de vectores retrovirales. Se utiliza una línea celular auxiliar para expresar constitutivamente algunas de las proteínas virales, mientras que otras proteínas virales se introducen en la línea celular auxiliar mediante transfección transitoria. Por ejemplo, un vector retroviral puede introducirse en una línea celular auxiliar que expresa constitutivamente gag-pol MLV. Para propagar el vector retroviral, puede introducirse un plásmido concebido para expresar G VSV en el sistema mediante transfección transitoria. Como otra variación de este tema, el propio vector retroviral puede codificar algunas de las proteínas virales (por ejemplo, Gag/Gag-Pol), y una línea celular auxiliar puede proporcionar otras proteínas virales (Env) (Boerkoel *et al.*, 1993). También pueden utilizarse enfoques que utilizan otros virus para administrar los constructos auxiliares retrovirales. Por ejemplo, se generó un virus del herpes simple modificado para contener gag, pol, y env retrovirales y para servir la función auxiliar. Del mismo modo, también se han utilizado vectores de adenovirus y vectores de expresión derivados del virus del bosque de Semliki para administrar genes codificantes de las proteínas virales de MLV a células auxiliares.

Vectores basados en diferentes retrovirus

Se han modificado muchos retrovirus para generar vectores que pueden transportar gen(es) de interés (transgén). Los vectores virales contienen generalmente todos los elementos que actúan en cis necesarios para la replicación viral y la expresión génica. También pueden ser necesarios elementos adicionales en vectores obtenidos a partir de algunos virus para garantizar la administración exitosa de genes. El requisito de estos elementos que actúan en cis a menudo pone manifiesto una mayor comprensión de la biología de estos virus. Además, para permitir una fácil manipulación de células bacterianas, la mayoría de los vectores retrovirales se encuentran en forma de plásmido y presentan una estructura que contiene el origen bacteriano de replicación y un gen resistente a antibióticos. Se realizan normalmente las siguientes etapas para producir partículas virales de vectores retrovirales. El ADN vector se introduce en primer lugar en las células auxiliares mediante transfección, electroporación, o lipofección. Tras la introducción del ADN en las células auxiliares, el ADN vector se integra en la célula auxiliar y se expresa. El ARN viral se expresa a partir de LTR 5' y consiste en todas las secuencias entre las dos regiones R. Este ARN viral contiene la señal de encapsidación y se encapsida en las partículas virales de manera eficiente. Durante la replicación retroviral, las secuencias de estructura del plásmido salen de las dos LTRs que no se transfieren a las células diana. Se describen a continuación las estructuras básicas de algunos vectores retrovirales obtenidos a partir de diferentes retrovirus.

Vectores obtenidos a partir de oncovirus

Los vectores obtenidos a partir de tres oncovirus diferentes se describirán en este caso para representar algunos de los vectores retrovirales utilizados más ampliamente. Los oncovirus solo pueden infectar células en división; por lo tanto, los vectores que se obtienen a partir de oncovirus solo pueden utilizarse para administrar eficazmente genes

en células en división. El requisito para la proliferación celular puede utilizarse a veces como una ventaja para orientar selectivamente células que se dividen rápidamente (por ejemplo, células cancerosas).

5 1. Vectores basados en virus de la leucemia murina. Actualmente, los vectores retrovirales basados en MLV y las células auxiliares son el sistema frecuentemente más utilizado para la administración génica. El desarrollo y la disponibilidad de los vectores desarrollados por ingeniería genética y las líneas celulares auxiliares han impulsado la popularidad de los vectores basados en MLV. Los vectores contienen secuencias virales que actúan en cis que son necesarias para la expresión génica y la replicación viral, tales como LTRs, PBS, PPT, y att. La señal de encapsidación puede ser una señal mínima o una señal más larga que se extiende en el marco de lectura abierto de gag (+). Cuando la + está presente en el vector, es necesario mutar el codón de iniciación de la traducción de gag para prevenir la expresión de la proteína Gag truncada. Se han concebido varios vectores para contener múltiples sitios de enzimas de restricción entre la señal de encapsidación y la región no traducida 3'. La presencia de estos sitios de clonación facilita la construcción de vectores que pueden expresar el gen de interés.

10 15 Los vectores basados en MLV pueden propagarse eficazmente en todas las líneas celulares auxiliares de MLV. Existen varias proteínas de la envoltura de MLV que dictan el rango de huésped de los vectores de MLV. Los virus que utilizan la envoltura ecotrópica pueden infectar células de ratón pero no las células obtenidas a partir de otras especies. Los virus que utilizan la envoltura anfotrópica pueden infectar tanto a células de ratón como células obtenidas a partir de otras especies, incluyendo células humanas. Los virus que utilizan la envoltura xenotrópica no pueden infectar células de ratón pero pueden infectar células obtenidas a partir de otras especies. Además, los vectores de MLV también pueden propagarse en líneas celulares auxiliares basadas en el virus de la necrosis del bazo (SNV). El SNV es un virus aviar que se relaciona vagamente con MLV. Sorprendentemente, las proteínas de SNV conservan la capacidad para interactuar con secuencias que actúan en cis de MLV y encapsidan ARN de MLV, transcriben de forma inversa el genoma de MLV, e integran el ARN de MLV en el huésped.

25 2. Vectores basados en el virus de la necrosis del bazo. Las secuencias virales requeridas en estos vectores son muy similares a los de los vectores de MLV. La señal de encapsidación de SNV, denotada E, no se extiende en el marco de lectura abierto de gag; por lo tanto, la mayoría de los vectores basados en SNV no contienen las regiones codificantes de gag. Similar a los vectores de MLV, los genes de interés se insertan en una región conectora que contiene múltiples sitios de restricción entre la señal de encapsidación y la región no traducida 3'. Los vectores basados en SNV pueden propagarse en líneas celulares auxiliares basadas en SNV, tales como C3A2, DSDH, DSH134G y DSN.

35 3. Vectores basados en el virus del sarcoma de Rous y en el virus de la leucosis aviar. El RSV es el único retrovirus oncogénico agudo conocido que es competente para la replicación. Además de gag-pol y env, RSV también codifica el oncogén v-src entre env y la LTR 3'. Un sitio aceptor de corte y empalme corriente arriba del v-src permite que el gen se exprese como cortado y empalmado. RSV posee la capacidad para codificar un gen adicional. Se han realizado diversas modificaciones para generar un vector viral competente para la replicación, ejemplo del cual es el reemplazo de v-src por un sitio aceptor de corte y empalme y varios sitios de enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN pueden insertarse en los sitios de restricción para generar un vector competente para la replicación que expresa el gen de interés.

40 También se ha modificado ALV para generar vectores que requieren células auxiliares para su propagación. Similar a los vectores de MLV y SNV descritos previamente, la estructura básica de un vector de ALV también contiene las LTRs 5' y 3', att, PBS, PPT, y una señal de encapsidación. La señal de encapsidación de ALV se extiende en el marco de lectura abierto de gag, y las partes pertinentes de gag se incluyen en vectores basados en ALV para lograr una encapsidación eficaz.

Vectores obtenidos a partir de lentivirus

50 A diferencia de los oncovirus, se ha demostrado que algunos lentivirus infectan las células quiescentes que no se dividen. Los lentivirus son retrovirus complejos que pueden requerirse para expresar proteínas accesorias para la regulación de su ciclo de replicación. Algunas de estas proteínas accesorias se unen a regiones del genoma viral para regular la expresión génica. Por lo tanto, los vectores basados en lentivirus necesitan incorporar elementos adicionales que actúan en cis de manera que pueda producirse la replicación viral y la expresión génica eficaz. Como ejemplos de vectores basados en lentivirus, se describen a continuación vectores basados en VIH-1 y VIH-2.

55 El vector de VIH-1 contiene elementos que actúan en cis que también se encuentran en los retrovirus simples. Se ha demostrado que las secuencias que se extienden en el marco de lectura abierto de gag son importantes para la encapsidación de VIH-1. Por lo tanto, los vectores de VIH-1 contienen a menudo la parte pertinente de gag en la que se ha mutado el codón de iniciación de la traducción. Además, la mayoría de los vectores de VIH-1 también contiene una parte del gen env que incluye RRE. Rev se une a RRE, que permite el transporte de ARNms empalmados y cortados individualmente o completos del núcleo al citoplasma. En ausencia de Rev y/o RRE, se acumulan en el núcleo ARNs de VIH-1 completos. Alternativamente, un elemento de transporte constitutivo de ciertos retrovirus simples, tales como el virus del mono Mason-Pfizer, puede utilizarse para atenuar el requisito de Rev y RRE. La transcripción eficiente del promotor de LTR de VIH-1 requiere la proteína viral Tat. Por lo tanto, es importante que Tat se exprese en las células diana si se requiere una transcripción eficiente de LTR de VIH-1. La necesidad para la

expresión de Tat puede satisfacerse expresando el gen Tat del vector retroviral. Alternativamente, expresando el gen de interés a partir de un promotor interno heterólogo puede eludirse la necesidad de expresión de Tat.

5 La mayoría de los vectores basados en VIH-2 es estructuralmente muy similar a los vectores de VIH-1. Similar a los vectores basados en VIH-1, los vectores VIH-2 también requieren RRE para el transporte eficaz de ARNs virales empalmados y cortados individualmente o completos.

10 Se ha demostrado también que el vector de VIH-1 puede propagarse a altos títulos virales utilizando proteínas virales del virus de inmunodeficiencia en simios. En un sistema, el vector y los constructos auxiliares provienen de dos virus diferentes, y la homología reducida de nucleótidos puede disminuir la probabilidad de recombinación. Además de los vectores basados en lentivirus de primates, también se han desarrollado vectores basados en el virus de la inmunodeficiencia felina como alternativa a los vectores obtenidos a partir del genoma patógeno del VIH-1. Las estructuras de estos vectores también son similares a los vectores basados en VIH-1.

15 Vectores obtenidos a partir de espumavirus

Los virus espumosos son retrovirus no convencionales cuyas muchas características en su ciclo de replicación son diferentes de las de los oncovirus y lentivirus. Aunque estos virus pueden ser tóxicos para las células cultivadas, no se tiene conocimiento alguno que los virus espumosos causen cualquier enfermedad en los huéspedes.

20 Un ejemplo de un vector de virus espumoso contiene las secuencias retrovirales típicas que actúan en cis. Además de las secuencias en la región no traducida 5', la parte 5' del marco de lectura abierto de gag y las secuencias en la parte 3' del marco de lectura abierto de pol son importantes para la encapsidación eficaz. Similar a los lentivirus, la expresión del promotor del virus espumoso humano se activa por la proteína viral Tas.

25 Diseño de vectores retrovirales

Los vectores retrovirales pueden contener muchas modificaciones diferentes que pueden tener varios fines para el terapeuta génico. Estas modificaciones pueden introducirse para permitir la expresión de más de un gen, regular la expresión génica, activar o inactivar los vectores virales, y eliminar las secuencias virales para evitar la generación de un virus competente para la replicación. Se describen a continuación algunos ejemplos de estas modificaciones.

A. Vectores convencionales

35 1. Expresión Génica dirigida por el promotor U3. El ARN viral completo se expresa a partir del promotor retroviral situado en la región U3 de LTR 5'. El ARN viral contiene R, U5, la región no traducida 5', un gen de interés, la región no traducida 3', U3, y R. El gen insertado entre las regiones no traducidas 5' y 3' puede traducirse a partir del ARN completo que se transcribe a partir del promotor U3.

40 Durante la propagación de las soluciones concentradas virales, es deseable a menudo expresar un gen marcador seleccionable en el vector de modo que puedan seleccionarse células auxiliares transfectadas o infectadas por los vectores virales. Por lo tanto, a menudo es necesario concebir vectores retrovirales que expresan un gen marcador seleccionable así como un gen de interés. Los genes de resistencia a fármacos se utilizan frecuentemente como marcadores seleccionables, pero otros genes marcadores, tales como el gen de la proteína verde fluorescente, también pueden utilizarse para seleccionar células transfectadas o infectadas. La expresión de dos genes en un vector retroviral puede obtenerse mediante la expresión del gen 3' al utilizar un promotor interno, corte y empalme de ARN, o sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

50 2. Vectores que utilizan un promotor interno para expresar genes adicionales. Un ejemplo de la expresión génica de un vector retroviral contiene un promotor interno, en el que, p. ej., el ARN completo que se expresa a partir del promotor U3 viral se utiliza para traducir un primer gen(es) de interés. El ARN subgenómico que se expresa a partir del promotor interno se utiliza para traducir un segundo gen(es) de interés.

55 3. Vectores que utilizan corte y empalme para expresar genes adicionales. Los retrovirus expresan env mediante corte y empalme regulado. El sitio donador de corte y empalme utilizado para expresar env se encuentra en la región no traducida 5' de los retrovirus. Durante la replicación, algunos ARNs virales completos se cortan y empalman para producir ARNs virales subgenómicos utilizados para expresar las proteínas Env. Los vectores de corte y empalme se desarrollaron utilizando el mismo principio para expresar dos genes diferentes utilizando los sitios aceptores de corte y empalme y donadores de corte y empalme virales. La ventaja de los vectores de corte y empalme es que solo se requiere un promotor, y cualquier potencial de interferencia del promotor se elimina.

60 4. Vectores que utilizan señales de control de traducción para expresar genes adicionales. Se demostró por primera vez en picornavirus que las secuencias en el ARNm pueden utilizarse como señales que permiten al ribosoma unirse al centro de un ARNm y traducir un gen lejos del extremo 5' del ARNm. Estas secuencias (llamadas IRES), se emplean comúnmente en vectores retrovirales. Además de las secuencias IRES identificadas en picornavirus, las secuencias IRES también se han identificado en las regiones no traducidas 5' de algunos retrovirus tales como MLV, SNV, y un virus endógeno similar a la partícula (LV30). Por lo tanto, también es posible utilizar estas secuencias

retrovirales IRES para expresar un segundo gen. Otras secuencias que permiten la expresión de múltiples proteínas a partir de una única transcripción son péptidos similares a autoescisión 2A (también llamados CHYSEL, elementos hidrolasa que actúan en cis) obtenidos a partir del virus de la enfermedad del pie y boca y otros picornavirus. Alternativamente, pueden utilizarse promotores bidireccionales para expresar dos genes del mismo promotor.

5

B. Vectores de doble copia

El hecho de que se dupliquen las secuencias de LTR en vectores retrovirales se ha explotado para construir vectores que contienen dos copias del gen de interés. Por ejemplo, el primer conjunto de vectores de doble copia contiene el gen de interés en la región U3 corriente arriba del viral. Estos genes se expresan utilizando ya sea un promotor de la ARN polimerasa II o un promotor de la ARN polimerasa III. Se ha demostrado que esta estrategia aumenta con éxito el nivel de la expresión génica. En otro ejemplo de un vector de doble copia, el vector contiene el gen de interés en el centro de la región R.

10

15 C. Vectores de autoinactivación

Uno de los problemas de seguridad asociados con el uso de vectores retrovirales para la terapia génica es que un virus competente para la replicación puede generarse durante la propagación de los vectores, que pueden conducir a la propagación accidental del vector terapéutico en los tejidos no diana. Para hacer frente a este problema, se concibió una clase de vectores para someterse a autoinactivación. El principio es que tras la administración génica, el vector eliminará algunos de los elementos que actúan en cis necesarios para completar otra serie de replicación. Por lo tanto, incluso en presencia de un virus competente para la replicación, estos vectores no pueden transferirse a otras células diana de manera eficiente. La generación de un virus competente para la replicación a veces implica la recombinación entre el plásmido auxiliar defectuoso y el vector codificante del gen de interés. Por lo tanto, otro posible beneficio del vector de autoinactivación es que puede disminuir la probabilidad de generar un virus competente para la replicación.

20

25

1. Vectores sin U3. Los vectores sin U3 fueron los primeros vectores retrovirales de autoinactivación en desarrollarse. Estos vectores se conciben para eliminar el promotor U3 viral durante la transcripción inversa de modo que el provirus en la célula diana carece de un promotor viral. En estos vectores, el U3 de la LTR 5' está intacto, mientras que el U3 de la LTR 3' se inactiva por un gran deleción. El ARN generado a partir de este vector contiene R, U5, región no traducida 5', gen(es) de interés, región no traducida 3', U3 eliminado, y R. Durante la transcripción inversa, U3 en el extremo 3' del ARN viral se utiliza normalmente como una plantilla para generar la LTR. Por lo tanto, el ADN viral sintetizado a partir del vector sin U3 a través de la transcripción inversa contiene secuencias U3 eliminadas en ambas LTRs. Dado que el promotor viral se elimina durante la transcripción inversa, el gen de interés está bajo el control de un promotor interno. La ventaja del vector sin U3 es que es potencialmente más segura, ya que se reduce la probabilidad de generación de un virus competente para la replicación. Sin embargo, a una baja frecuencia, puede producirse que la recombinación durante la transfección de ADN regenere el U3 en la LTR 3'. Si esto sucede, el vector resultante seguirá conteniendo el promotor en el U3 y por consiguiente retiene dos LTRs completas. Se han realizado modificaciones adicionales en algunos vectores sin U3 para disminuir la homología entre las LTR 5' y 3', reduciendo la probabilidad de recombinación y regeneración de una LTR intacta durante la transfección de ADN.

30

35

40

2. Vectores Cre/loxP. La recombinasa Cre, una recombinasa específica de sitio de origen natural del bacteriófago P1, reconoce una secuencia de 32 pb denominada loxP. Cre puede mediar de manera eficiente en la recombinación específica del sitio utilizando dos sitios loxP separados por secuencias de longitudes variables. Los eventos de recombinación incluyen deleción, inserción, e inversión de las secuencias entre los sitios loxP. Este sistema se ha explotado para desarrollar vectores retrovirales de autoinactivación (Choulika *et al.*, 1996; Russ *et al.*, 1996). Un ejemplo de dicho vector contiene una LTR 5' intacta y todos los elementos que actúan en cis necesarios para la replicación retroviral. El vector contiene el gen de la recombinasa cre que se expresa utilizando un promotor interno. La LTR 3' se ha modificado mediante la inserción de varias secuencias en el U3, incluyendo un sitio loxP, un promotor, y un gen de interés; además, el U3 3' contiene a menudo una deleción para reducir la actividad del promotor. El ARN viral completo se encapsida en viriones, y tras la infección de las células diana, el ARN viral se transcribe de forma inversa. La secuencia U3 3' se utiliza como una plantilla para sintetizar ambas LTRs; por consiguiente, las secuencias en ambas LTRs contienen una copia del sitio loxP, un promotor, y un gen de interés. El gen cre se expresa, y la recombinasa Cre se sintetiza en las células diana infectadas. La recombinasa Cre media a continuación la deleción de secuencias entre los dos sitios loxP en el ADN viral, traduciéndose en la supresión de la LTR 5', de la región no traducida 5', del promotor interno, y cre. Como resultado, el provirus en las células diana contiene solo una LTR que expresa el gen de interés.

50

55

60

Utilizando el mismo principio, el sistema Cre/loxP puede utilizarse para eliminar diferentes secuencias en el vector retroviral así como eliminar partes del constructo auxiliar en las células de encapsidación. Otra aplicación del sistema Cre/loxP es que puede utilizarse para eliminar el marcador seleccionable de un vector retroviral después de integrar el ADN viral en el cromosoma de las células diana. El marcador seleccionable se incluye en el vector de modo que puedan seleccionarse las células auxiliares transfectadas con el vector de ADN. La deleción del marcador seleccionable es deseable debido a que la presencia del marcador seleccionable puede conducir a la interferencia

65

del promotor o a una respuesta inmunitaria contra las células transducidas. La delección del marcador seleccionable se realiza mediante la inserción de dos sitios loxP que flanquean el gen marcador seleccionable. Después de introducirse el vector en las células diana por infección, las células diana se infectan con otro vector que expresa la recombinasa Cre. La recombinasa Cre elimina a continuación las secuencias entre los dos sitios loxP, que incluyen el marcador seleccionable. Como resultado, el provirus definitivo solo expresa el gen de interés.

D. Vectores de autoinactivación y de autoactivación

En función de las propiedades y los efectos de los productos génicos, puede desearse tener un gen inactivado de interés en las células auxiliares y activar este gen tras la administración a las células diana. Por ejemplo, si el producto del gen de interés es citotóxico, expresar el gen en células auxiliares podría dar lugar a la toxicidad y lo más probable reducir o eliminar la producción viral. Se han generado una serie de vectores para activar simultáneamente un gen e inactivar el vector durante la administración génica. Esto se logra mediante la delección frecuente de las secuencias directamente repetidas durante la transcripción inversa. Si las secuencias directamente repetidas se encuentran en un virus, puede eliminarse una copia de repetición directa y todas las secuencias entre las dos repeticiones a altas frecuencias durante la transcripción inversa. Se ha explotado esta propiedad de transcriptasas inversas para generar vectores retrovirales de autoactivación y de autoinactivación.

E. Vectores orientados selectivamente a células específicas

Un objetivo importante para los terapeutas génicos es desarrollar un medio para orientar selectivamente la administración génica a tipos celulares o tisulares específicos. Al menos se han utilizado dos estrategias en un esfuerzo para orientar selectivamente la administración génica utilizando vectores retrovirales. Se concibe una estrategia para controlar la administración génica en el punto de entrada del virus a la célula huésped utilizando proteínas modificadas o naturales de la envoltura genéticamente que interactúan con los receptores específicos de tipo celular. Se concibe otra estrategia para controlar la expresión del gen terapéutico en tipos celulares específicos utilizando promotores específicos de tejido.

F. Vectores que utilizan promotores específicos de tipo celular

Los promotores que son activos en ciertos tejidos o responden a ciertos reactivos pueden utilizarse para regular la expresión de un gen de interés. Estos promotores pueden insertarse entre las LTRs de un vector retroviral. Alternativamente, el promotor regulado puede utilizarse para reemplazar el promotor viral en la región U3. El diseño de un vector retroviral con un promotor específico de tejido interno es similar al de otros vectores retrovirales que contienen promotores internos.

Virus con rango de huésped

1. Consideraciones para la selección de la envoltura y virus de rango de huésped. La naturaleza de la proteína de la envoltura viral determina si un cierto virus puede entrar en una célula diana. Por lo tanto, es importante considerar si las células diana poseen el receptor de superficie celular apropiado antes de la selección de una proteína de la envoltura que se utilizará para la producción de virus (como ya se ha discutido previamente).

La partícula del vector retroviral según la invención también podrá transducir células que se dividen gradualmente, y cuyos no lentivirus tales como MLV no son capaces de transducirse eficazmente. Las células que se dividen gradualmente se dividen aproximadamente una vez cada tres o cuatro días incluyendo ciertas células tumorales. Aunque los tumores contienen células que se dividen rápidamente, algunas células tumorales, especialmente aquellas en el centro del tumor, rara vez se dividen. Alternativamente, la célula diana puede ser una célula de crecimiento detenido capaz de experimentar la división celular tal como una célula en una parte central de una masa tumoral o una célula madre tal como una célula madre hematopoyética o una célula CD34 positiva. Como alternativa adicional, la célula diana puede ser un precursor de una célula diferenciada tal como un precursor monocitario, una célula CD33 positiva, o un precursor mielóide. Como alternativa adicional, la célula diana puede ser una célula diferenciada, tal como neuronas, astrocitos, células gliales, células microgliales, macrófagos, monocitos, células epiteliales, células endoteliales o hepatocitos. Las células diana pueden transducirse bien *in vitro* tras el aislamiento de un individuo humano o bien pueden transducirse directamente *in vivo*.

Vectores obtenidos a partir de adenovirus

El adenovirus es un virus de ADN bicatenario lineal que no pasa a través de un intermedio de ARN. Hay más de 50 serotipos diferentes de adenovirus humanos divididos en 6 subgrupos basados en la homología de secuencia genética, todos ellos exhiben una organización genética comparable. Los serotipos 2 y 5 del grupo C de adenovirus humano (con una homología de secuencia al 95 %) son los más utilizados en sistemas de vectores adenovirales y se asocian normalmente con infecciones del tracto respiratorio superior en los jóvenes.

Los adenovirus/vectores adenovirales de la invención pueden tener origen humano o animal. Con respecto a los adenovirus de origen humano, los adenovirus preferentes son los clasificados en el grupo C, en particular, los

adenovirus de tipo 2 (Ad2), 5 (Ad5), 7 (Ad7) o 12 (Ad12). Más preferentemente, es un adenovirus Ad2 o Ad5. Entre los diferentes adenovirus de origen animal, pueden utilizarse adenovirus canino, adenovirus murino o un adenovirus aviar, tales como el virus CELO (Cotton *et al.*, 1993, *J Virol* 67:3777-3785). Con respecto a los adenovirus de origen animal se prefiere utilizar los adenovirus de origen canino, y especialmente las cepas de los adenovirus CAV2 [cepa manhattan o A26/61 (por ejemplo, ATCC VR-800)]. Otros adenovirus de origen animal incluyen los citados en la solicitud del documento WO-A-94/26914 incorporado en el presente documento por referencia.

Como se ha mencionado previamente, la organización del genoma del adenovirus es similar en todos los grupos de adenovirus y las funciones específicas se sitúan generalmente en lugares idénticos para cada serotipo estudiado. El genoma de los adenovirus comprende una repetición terminal invertida (ITR) en cada extremo, una secuencia de encapsidación (Psi), genes tempranos y genes tardíos. Los principales genes tempranos se han clasificado en una serie de intermedios tempranos (E1a), temprano retrasado (E1b, E2a, E2b, E3 y E4), y regiones intermedias. Entre estos, los genes contenidos en la región E1, en particular, son necesarios para la propagación viral. Los principales genes tardíos se contienen en las regiones L1 a L5. El genoma del adenovirus Ad5 se ha secuenciado completamente y se dispone en una base de datos (véase, en particular, acceso a Genbank n.º M73260). Del mismo modo, también se han secuenciado las partes, o incluso la totalidad de otros genomas adenovirales (tales como Ad2, Ad7, Ad12).

Para su uso como vectores recombinantes, normalmente se modifica un adenovirus para que no sea capaz de replicarse en una célula infectada.

Por consiguiente, las construcciones descritas en la técnica anterior incluyen adenovirus eliminados de la región E1, esenciales para la replicación viral, en los que se insertan las secuencias de ADN heterólogo (Levrero *et al.*, 1991, *Gene* 101:195; Gosh-Choudhury *et al.*, 1986, *Gene* 50:161). Además, para mejorar las propiedades del vector, se ha propuesto crear otras deleciones o modificaciones en el genoma del adenovirus. Por consiguiente, se ha introducido una mutación puntual sensible al calor en el mutante ts125, por lo que es posible inactivar la proteína de unión a ADN de 72 kDa (DBP). Preferentemente, un vector adenoviral recombinante utilizado en la invención comprende una deleción en la región E1 de su genoma. Más particularmente, comprende una deleción en las regiones E1a y E1b. Según un modo particularmente preferente, la región E1 se inactiva por deleción de un fragmento PvuII-BglIII que se extiende desde el nucleótido 454 hasta el nucleótido 3328, en la secuencia del adenovirus Ad5 (acceso a Genbank n.º M73260). En otra realización preferente, la región E1 se inactiva por deleción de un fragmento HinfII-Sau3A que se extiende desde el nucleótido 382 al nucleótido 3446.

Otros vectores adenovirales comprenden una deleción de otra región esencial para la replicación viral y/o la propagación, la región E4. La región E4 se implica en la regulación de la expresión de los genes tardíos, en la estabilidad de los ARNs nucleares tardíos, en la disminución de la expresión de proteínas de la célula huésped y en la eficiencia de la replicación del ADN viral. Los vectores adenovirales en los que se eliminan las regiones E1 y E4, poseen, por lo tanto, una expresión génica viral y un ruido de fondo transcripcional reducidos. Dichos vectores se han descrito por ejemplo en las solicitudes de los documentos WO-A-94/28152, WO-A-95/02697, WO-A-96/22378. Además, también se han descrito los vectores que transportan una modificación del gen IVa2 (documento WO-A-96/10088).

Según una variante preferente, un vector adenoviral recombinante utilizado en la invención comprende, además, una deleción en la región E4 de su genoma. Más particularmente, la deleción en la región E4 afecta a todos los marcos de lectura abiertos. Se pueden citar, a modo de ejemplo preciso, deleciones de nucleótidos 33466-35535 o 33093-35535. En particular, los vectores preferentes comprenden una deleción de toda la región E4. Esto puede llevar a cabo la eliminación o la escisión de un fragmento MaeIII-MscI correspondiente a los nucleótidos 35835-32720. Otros tipos de deleciones en la región E4 se describen en las solicitudes de los documentos WO-A-95/02697 y WO-A-96/22378, que se incorporan en el presente documento por referencia.

Alternativamente, solo se elimina una parte funcional de E4. Esta parte comprende, al menos, los marcos ORF3 y ORF6. A modo de ejemplo, estos marcos codificantes pueden eliminarse del genoma en forma de fragmentos PvuII-AluI y BglIII-PvuII, respectivamente, correspondientes a los nucleótidos 34801-34329 y 34115-33126, respectivamente. Las deleciones de la región E4 del virus Ad2 dl808 o de los virus Ad5 dl1004, Ad5 dl1007, Ad5 dl1011 o Ad5 dl1014 también pueden utilizarse en el marco de la invención.

Las posiciones proporcionadas previamente se refieren a la secuencia del adenovirus Ad5 de tipo natural como se publicó y es accesible en una base de datos. Aunque pueden existir variaciones menores entre los diversos serotipos de adenovirus, estas posiciones se aplican generalmente a la construcción de adenovirus recombinantes según la invención a partir de cualquier serotipo, y especialmente los adenovirus Ad2 y Ad7.

Además, los adenovirus producidos pueden poseer otras alteraciones en su genoma. En particular, pueden eliminarse otras regiones para aumentar la capacidad del virus y reducir sus efectos secundarios relacionados con la expresión de genes virales. De este modo, en particular, puede eliminarse la totalidad o parte de la región E3 o IVa2. En cuanto a la región E3, sin embargo, puede ser particularmente preferente conservar la parte codificante de la proteína gp19K. De hecho, esta proteína permite evitar que el vector adenoviral convierta el sujeto de una reacción

inmunitaria que (i) limitaría su acción y (ii) podría tener efectos secundarios indeseables. Según un modo específico, la región E3 se elimina y la secuencia codificante de la proteína gp19K se reintroduce bajo el control de un promotor heterólogo.

5 El polinucleótido de la invención/NOI puede insertarse en diversos sitios del genoma recombinado. Se puede insertar en la región E1, E3 o E4, como un reemplazo para las secuencias eliminadas o excedentes. También puede insertarse en cualquier otro sitio, fuera de las secuencias necesarias en *cis* para la producción de los virus (secuencias ITR y secuencia de encapsidación).

10 La región E2 es esencial, ya que codifica la proteína de unión a ADN de 72 kDa, la ADN polimerasa y el precursor de 80 kDa de la proteína terminal (TP) de 55 kDa necesaria para el cebado de proteínas que inician la síntesis del ADN.

15 Un enfoque alternativo para realizar un virus más defectuoso ha sido "replicar" manteniendo completamente solo las repeticiones terminales necesarias para la replicación viral. Los virus "replicantes" o virus "no replicantes" pueden cultivarse en títulos altos con un virus auxiliar de primera generación en la línea celular 293.

Los adenovirus recombinados se producen normalmente en una línea celular de encapsidación, que es una línea celular capaz de complementar en *trans* una o más de las funciones carentes del genoma adenoviral recombinado. Una de estas líneas es, por ejemplo la línea 293, en la que se ha integrado parte del genoma del adenovirus. Más precisamente, la línea 293 es una línea celular embrionaria renal humana que contiene el extremo izquierdo (aproximadamente 11-12 %) del genoma del adenovirus de serotipo 5 (Ad5), que comprende la ITR izquierda, la región de encapsidación, la región E1, incluyendo E1a y E1b, la proteína pIX codificante de la región y parte de la proteína pIVa2 codificante de la región. Esta línea es capaz de transcomplementar adenovirus recombinados defectuosos para la región E1, es decir, carecen de toda o una parte de la región E1, y producir soluciones concentradas virales que presentan altos títulos. Esta línea también es capaz de producir, a una temperatura permisiva (32 °C), las soluciones concentradas de virus que comprenden, además, la mutación E2 sensible al calor.

Se han descrito otras líneas celulares capaces de complementar la región E1, basadas en particular, en células de carcinoma de pulmón humano A549 (documento WO-A-94/28152) o en retinoblastos humanos (*Hum. Gen. Ther.* (1996) 215). Además, se han descrito también líneas celulares capaces de transcomplementar varias funciones de adenovirus, por ejemplo, líneas celulares que complementan las regiones E1 y E4 (Yeh *et al.*, 1996, *J. Virol* 70:559; Krougliak *et al.*, 1995, *Hum Gen. Ther.* 6:1575) y líneas que complementan las regiones E1 y E2 (documentos WO-A-94/28152, WO-A-95/02697, WO-A-95/27071).

Los adenovirus recombinantes se producen generalmente mediante la introducción del ADN viral en la línea de encapsidación, seguido por la lisis de las células después de aproximadamente 2 o 3 días (la cinética de ciclo adenoviral es de 24 a 36 horas). Para realizar el proceso, el ADN viral introducido puede ser el genoma viral recombinado completo, construido opcionalmente en una bacteria (documento WO-A-96/25506) o en una levadura (documento WO-A-95/03400), transfectado a las células. También puede ser un virus recombinado utilizado para infectar la línea de encapsidación. El ADN viral también puede introducirse en forma de fragmentos que transportan cada parte del genoma viral recombinado y una región de homología que hace que sea posible, tras la introducción en la célula de encapsidación, reconstituir el genoma viral recombinado por recombinación homóloga entre los diversos fragmentos.

Los adenovirus competentes para la replicación también pueden utilizarse en la terapia génica. Por ejemplo, el gen E1a puede introducirse en un virus de primera generación bajo la regulación de un promotor específico de tumor. En teoría, tras la inyección del virus en un tumor, podría replicarse específicamente en el tumor pero no en las células normales circundantes. Este tipo de vector podría utilizarse ya sea para matar las células tumorales directamente por lisis o para administrar un "gen suicida", tal como el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV tk), que puede matar las células infectadas y de activación inespecífica después del tratamiento con ganciclovir.

Por consiguiente, dado que el constructo HRE de la presente invención puede estar preferentemente activo en cierto tejido tumoral en virtud de las condiciones hipóxicas que existen en muchas masas tumorales sólidas, la presente invención proporciona un vector de adenovirus que comprende un polinucleótido de la invención operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico codificante de un polipéptido E1a adenoviral. El polipéptido E1a bajo el control del potenciador HRE solo se expresaría en condiciones hipóxicas y, por tanto, el adenovirus solo sería competente para la replicación en condiciones hipóxicas. El adenovirus carece de un gen E1 endógeno, y preferentemente también carece de un gen E3 endógeno. Se han descrito previamente otras regiones que pueden eliminarse del genoma del adenovirus. También puede ser deseable incluir la totalidad o parte del gen E3 bajo el control de un elemento de respuesta a la hipoxia de tal manera que la modulación inmunitaria de la célula huésped se equilibra para obtener la propagación viral correcta en el tumor y la respuesta inmunitaria en las células infectadas.

Se ha utilizado específicamente un adenovirus defectuoso solo para E1b para el tratamiento antitumoral de ensayos clínicos en fase 1. Los polipéptidos codificados por E1b son capaces de bloquear la apoptosis mediada por p53,

impidiendo que la célula se mate a sí misma en respuesta a la infección viral. Por consiguiente, en las células normales no tumorales, en ausencia de Elb, el virus es incapaz de bloquear la apoptosis y por consiguiente es incapaz de producir y propagar un virus infeccioso. En las células tumorales carentes de p53, el virus defectuoso Elb puede crecer y propagarse en las células tumorales defectuosas de p53 adyacentes pero no a las células normales. Una vez más, este tipo de vector también podría utilizarse para administrar un gen terapéutico tal como HSV *tk*.

Por consiguiente, se prefiere que los adenovirus que expresan E1a de la presente invención carezcan de un gen Elb funcional.

Otros genes virales esenciales también pueden ponerse bajo el control de un elemento regulador sensible a la hipoxia.

Vectores obtenidos a partir de virus del herpes simple

1. Cepas virales

Los vectores del HSV de la invención pueden obtenerse a partir de, por ejemplo, cepas HSV1 o HSV2, o derivados de los mismos, preferentemente HSV1. Los derivados incluyen recombinantes inter-tipo que contienen ADN de cepas HSV1 y HSV2. Los derivados tienen preferentemente al menos una homología de secuencia al 70 % en cualquiera de los genomas HSV1 o HSV2, más preferentemente al menos 90 %, incluso más preferentemente 95 %.

El uso de cepas de HSV en procedimientos terapéuticos requerirá que las cepas se atenúen de modo que no pueden establecer un ciclo lítico. En particular, si los vectores de HSV se van a utilizar para la terapia génica en seres humanos el polinucleótido debe insertarse preferentemente en un gen esencial. Esto se debe a que podría producirse por recombinación si un virus del vector encuentra una transferencia de virus de tipo natural de un gen heterólogo al virus de tipo natural. Sin embargo, siempre que el polinucleótido se inserte en un gen esencial, esta transferencia recombinacional eliminaría también el gen esencial en el virus receptor y evitaría el "escape" del gen heterólogo en la población de virus de tipo natural competente para la replicación.

Las cepas atenuadas pueden utilizarse para producir la cepa de HSV de la presente invención, en este caso se proporcionan solo como ejemplos, incluyendo cepas que tienen mutaciones en ICP34.5 o ICP27, por ejemplo, la cepa 1716 (MacLean *et al.*, 1991, *J Gen Virol* 72: 632-639), las cepas R3616 y R4009 (Chou y Roizman, 1992, *PNAS* 89: 3266-3270) y R930 (Chou *et al.*, 1994, *J. Virol* 68: 8304-8311) todas las cuales tienen mutaciones en ICP34.5, y d27-1 (Rice y Knipe, 1990, *J. Virol* 64: 1704-1715) que tiene una delección en ICP27. Alternativamente, las cepas eliminadas de ICP4, IPC0, ICP22, ICP6, ICP47, *vhs* o gH, con una mutación de inactivación en VMW65, o con cualquier combinación de los anteriores también pueden utilizarse para producir cepas de HSV de la invención.

La terminología utilizada en la descripción de los diversos genes de HSV es tal como se halla en Coffm y Latchman, 1996. *Herpes simple virus-based vectors*. En: Latchman DS (ed). *Genetic manipulation of the nervous system*. Academic Press: Londres, págs. 99-114.

2. Líneas celulares de complementación

Los virus de HSV defectuosos en ICP27 se propagan en una línea celular que expresa ICP27, por ejemplo, células V27 (Rice y Knipe, 1990, *J. Virol* 64: 1704-1715) o células 2-2 (Smith *et al.*, 1992, *Virology* 186: 74-86). Las líneas celulares que expresan ICP27 pueden producirse por cotransfección de células de mamífero, por ejemplo, las células Vero o BHK, con un vector, preferentemente un vector plasmídico, que comprende un gen ICP27 de HSV funcional capaz de expresarse en dichas células, y un vector, preferentemente un vector plasmídico, que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo de resistencia a neomicina. Los clones que poseen el marcador seleccionable se exploran adicionalmente para determinar qué clones expresan también ICP27 funcional, por ejemplo a partir de su capacidad para soportar el crecimiento de las cepas de HSV mutante ICP27, utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, como se describe en Rice y Knipe, 1990).

Las líneas celulares que no permiten la reversión de una cepa de HSV mutante ICP27 a un cepa con ICP27 funcional se producen como se han descrito previamente, garantizando que el vector que comprende un gen ICP27 funcional no contenga secuencias que se superpongan con (es decir, son homólogas a) las secuencias restantes en el virus mutante ICP27.

Cuando las cepas de HSV de la invención comprenden modificaciones de inactivación en otros genes esenciales, por ejemplo ICP4, las líneas celulares de complementación comprenderán además un gen de HSV funcional que complementa el gen esencial modificado de la misma manera como se describe para ICP27.

3. Métodos de mutación

Los genes de HSV pueden volverse funcionalmente inactivos mediante varias técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, pueden volverse funcionalmente inactivos mediante deleciones, sustituciones o inserciones, preferentemente por deleción. Las deleciones pueden eliminar partes de los genes o el gen completo. Las secuencias insertadas pueden incluir el casete de expresión que se ha descrito previamente.

Las mutaciones se realizan en las cepas de HSV por métodos de recombinación homóloga bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el ADN genómico de HSV se transfecta junto con un vector, preferentemente un vector plasmídico, que comprende la secuencia mutada flanqueada por secuencias homólogas de HSV. La secuencia mutada puede comprender deleciones, inserciones o sustituciones, todas ellas pueden construirse por técnicas rutinarias. Las inserciones pueden incluir genes marcadores seleccionables, por ejemplo *lacZ*, para la exploración de virus recombinados mediante, por ejemplo, la actividad de β -galactosidasa.

Las mutaciones también pueden realizarse en otros genes de HSV, por ejemplo, genes, tales como ICP0, ICP4, ICP6, ICP22, ICP47, VMW65, gH o *vhs*. En el caso del gen VMW65, no se elimina todo el gen ya que codifica una proteína estructural esencial, pero se realiza una pequeña inserción de inactivación que suprime la capacidad de VMW65 para activar transcripcionalmente genes IE (Ace *et al.*, 1989, *J Virol* 63: 2260-2269).

4. Cepas de HSV que comprenden un transgén y miARN de la invención

Un transgén y un microARN de la invención pueden insertarse en el genoma de HSV en cualquier ubicación siempre que el virus se pueda propagar aún, que puede requerir el uso de una línea celular que transporta otro gen esencial de HSV (según se describe en 2.) si NOI se inserta en un gen esencial.

Las secuencias de la invención pueden insertarse en el genoma de HSV por recombinación homóloga de cepas de HSV con, por ejemplo, vectores plasmídicos que transportan el casete de expresión flanqueado por secuencias de HSV, como se ha descrito previamente para la introducción de mutaciones. El polinucleótido puede introducirse en un vector plasmídico adecuado que comprende secuencias de HSV utilizando técnicas de clonación bien conocidas en la materia.

Otros vectores virales

Otros vectores virales que pueden utilizarse en la presente invención incluyen virus adeno-asociados, virus de estomatitis vesicular, virus vacuna y vectores virales basados en SV-40.

Administración

El miARN y el transgén pueden administrarse a un paciente o utilizarse para producir una planta transgénica o un animal no humano. El término "administrado" incluye la administración por técnicas virales o no virales. Como se ha descrito previamente, los mecanismos de administración viral incluyen, entre otros, vectores adenovirales, virales adeno-asociados (AVV), vectores virales del herpes, vectores retrovirales, vectores lentivirales y vectores de baculovirus, etc. Los mecanismos de administración no virales incluyen la transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfífilos faciales catiónicos (CFAs) y combinaciones de los mismos.

Enfermedades

La administración de uno o más genes terapéuticos mediante un sistema de vector según la presente invención puede utilizarse solo o en combinación con otros tratamientos o componentes del tratamiento.

Por ejemplo, el vector de la presente invención puede utilizarse para administrar uno o más transgén(es) útil(es) en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO-A-98/05635. Para facilitar la referencia, parte de este listado se proporciona a continuación: cáncer, inflamación o enfermedad inflamatoria, trastornos dermatológicos, fiebre, efectos cardiovasculares, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infecciones agudas, infección por VIH, estados de choque, reacciones de injerto contra huésped, enfermedad autoinmune, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de aspirina; crecimiento, invasión y extensión tumorales, angiogénesis, metástasis, ascitis maligna y derrame pleural maligno; isquemia cerebral, cardiopatía isquémica, osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, asma, esclerosis múltiple, neurodegeneración, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, ictus, vasculitis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; periodontitis, gingivitis; psoriasis, dermatitis atópica, úlceras crónicas, epidermolísis bullosa; ulceración corneal, retinopatía y cicatrización quirúrgica; rinitis, conjuntivitis alérgica, eczema, anafilaxis; restenosis, insuficiencia cardíaca congestiva, endometriosis, aterosclerosis o endoesclerosis.

Además, o alternativamente, el vector de la presente invención puede utilizarse para administrar uno o más transgén(es) útil(es) en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO-A-98/07859. Para facilitar la referencia, parte de este listado se proporciona a continuación: actividad de proliferación/diferenciación de citocina

y celular; actividad inmunosupresora o inmunoestimulante (p. ej., para tratar una inmunodeficiencia, incluyendo la infección por virus de inmunodeficiencia humana; regulación del crecimiento de linfocitos; tratamiento del cáncer y de muchas enfermedades autoinmunes, y para prevenir el rechazo del trasplante o inducir la inmunidad tumoral); regulación de la hematopoyesis, p. ej., el tratamiento de las enfermedades mieloides o linfoides; favorecer el crecimiento de hueso, cartílago, tendón, ligamento y tejido nervioso, p. ej., para cicatrizar heridas, el tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y neurodegeneración; inhibición o activación de la hormona estimulante del folículo (modulación de la fertilidad); actividad quimiotáctica/quimiocinética (p. ej., para movilizar tipos celulares específicos de los sitios de lesión o de infección); actividad hemostática y trombolítica (p. ej., para tratar la hemofilia y el ictus); actividad antiinflamatoria (para tratar, p. ej., el choque séptico o la enfermedad de Crohn); como antimicrobianos; moduladores de, p. ej., el metabolismo o el comportamiento; como analgésicos; en el tratamiento de trastornos de deficiencia específicos; en el tratamiento de, p. ej., la psoriasis en medicina humana o veterinaria.

Además, o alternativamente, el vector retroviral de la presente invención puede utilizarse para administrar uno o más transgén(es) útil(es) en el tratamiento de los trastornos enumerados en el documento WO-A-98/09985. Para facilitar la referencia, parte de este listado se proporciona a continuación: actividad inhibidora de macrófagos y/o de linfocitos T y, de este modo, la actividad antiinflamatoria; actividad antiinmunitaria, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada con la inflamación; inhibición de la capacidad de los macrófagos y de los linfocitos T para adherirse a componentes de la matriz extracelular y la fibronectina, así como de regular la expresión del receptor fas por el aumento en linfocitos T; inhibición de una reacción inmunitaria no deseada y de la inflamación, incluyendo artritis, incluyendo artritis reumatoide, inflamación asociada a hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus sistémico eritematoso, enfermedades del colágeno y otras enfermedades autoinmunes, inflamación asociada con aterosclerosis, arterioesclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de distrés respiratorio u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada a úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas, enfermedades periodontales u otras enfermedades dentales, orquitis o epidídimo-orquitis, infertilidad, traumatismo orquidal u otras enfermedades testiculares relacionadas por el sistema inmunitario, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas inmunitarias y/o relacionadas con inflamación, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, p. ej., retinitis o edema macular cistoide, oftalmía simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunitarios e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fundus, componentes inflamatorios del traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vítreo-retinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, p. ej., tras una operación de filtración de glaucoma, reacción inmunitaria y/o de inflamación contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas inmunitarias y relacionadas con inflamación, inflamación asociada con enfermedades o afecciones o trastornos autoinmunitarios en los que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, la supresión inmunitaria y/o de inflamación resultaría beneficiosa, enfermedad de Parkinson, complicaciones y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia relacionada con el SIDA-encefalopatía relacionada con el VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades afecciones o trastornos degenerativos del SNC, componentes inflamatorios del ictus, síndrome postpolio, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barré, corea de Sydenham, miastenia grave, pseudotumores cerebrales, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de la compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de las atrofas y distrofias musculares, y enfermedades relacionadas inmunitarias e inflamatorias, afecciones o trastornos de los sistemas nervioso central y periférico, inflamación postraumática, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones o efectos secundarios inflamatorios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante, complicaciones y efectos secundarios inflamatorios y/o inmunitarios de la terapia génica, p. ej., debidos a la infección por un transportador viral, o inflamación asociada a SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, para tratar o mejorar las enfermedades proliferativas de monocitos o de leucocitos, p. ej., leucemia, mediante la reducción de la cantidad de monocitos o de linfocitos, para la prevención y/o tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células naturales o artificiales, de tejido y de órganos, tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de piel natural o artificial.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar a un individuo mediante terapia génica, comprendiendo la composición una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de la presente invención que comprende uno o más o transgén(es) administrables de diagnóstico y/o terapéutico o una partícula viral producida por u obtenida del mismo. La composición farmacéutica puede utilizarse para uso humano o animal. Normalmente, un médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular.

La composición puede comprender opcionalmente un transportador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del transportador, excipiente o diluyente farmacéutico puede

seleccionarse con respecto a la vía de administración y la práctica farmacéutica convencional pretendidas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el transportador, excipiente o diluyente cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de revestimiento, agente(s) solubilizantes apropiados, y otros agentes transportadores que pueden ayudar o aumentar la entrada viral en el sitio diana (tal como, por ejemplo, un sistema de administración de lípidos).

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante uno cualquiera o más de: inhalación, en forma de un supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo, mediante el uso de un parche cutáneo, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, o bien solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vías intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse de la mejor manera en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo bastantes sales o monosacáridos para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o píldoras que pueden formularse de manera convencional.

La administración de uno o más genes terapéuticos mediante un sistema de vector según la invención puede utilizarse solo o en combinación con otros tratamientos o componentes de tratamiento. Las enfermedades que pueden tratarse incluyen, entre otras: cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades hereditarias, enfermedades cardíacas, ictus, artritis, infecciones virales y enfermedades del sistema inmunitario. Los genes terapéuticos adecuados incluyen los que codifican las proteínas supresoras tumorales, enzimas, enzimas activadoras de profármacos, moléculas inmunomoduladoras, anticuerpos, moléculas similares a inmunoglobulina desarrolladas por ingeniería genética, proteínas de fusión, hormonas, proteínas de membrana, proteínas o péptidos vasoactivos, citocinas, quimiocinas, proteínas antivirales, ARN antisentido y ribozimas.

Ejemplos

Construcción del plásmido

Las secuencias de todos los miARNs utilizados en este caso se obtuvieron a partir del Registro del miARN (Griffiths-Jones *et al.*, 2006) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>). Las secuencias diana de miARN (mirT) se construyeron de la siguiente manera:

Para la diana 4x.mir-142-3p. (mir-142-3pT) se hibridaron los siguientes oligonucleótidos:

**5'CTAGAGTCGACTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACAAC
CGGT (S1)**

5'TGTAGTGTTTCCTACTTTATGGAATCGTGTAGTGTTTCCTACTTTATGGAGTCGACT (AS1),

5'TCCATAAAGTAGGAAACACTACATCACTCCATAAAGTAGGAAACACTACAC (S2),

**5'TCGAGTGTAGTGTTTCCTACTTTATGGAGTGATGTAGTGTTTCCTACTTTATGGAACCGGT
(AS2).**

El ligamento de estos oligonucleótidos creó un fragmento de ADN bicatenario con extremos cohesivos XbaI y XhoI. Las secuencias subrayadas se diseñan para ser perfectamente complementarias a un miARN específico. Los oligonucleótidos hibridados se subclonaron en los sitios XbaI y XhoI de pBluescriptII.KS. Los vectores resultantes se digirieron posteriormente con SacII y KpnI, NheI y AgeI, o Sall, y el fragmento de mirT se aisló del ligamento en los sitios apropiados de los vectores receptores: pCCL.sin.cPPT.PGK.GFP.WPRE para crear pCCL.sin.cPPT.PGK.GFP.WPRE.mirT pCCL.sin.cPPT-PGKaS-GFPas-CTEas-polyAas para crear pCCL.sin.cPPT.PGKas.GFPas.mirTas.CTEas.polyAas pCCL.sin.cPPT.PGK.ΔLNGFR.WPRE para crear pCCL.sin.cPPT.PGK.ΔLNGFR.mirT.WPRE pRRL.sin.cPPT.CMV.hFIX.WPRE para crear pRRL.sin.cPPT.CMV.hFIX.WPRE.mirT. pRRL.sin.cPPT.ET.hFIX.WPRE para crear pRRL.sin.cPPT.ET.hFIX.WPRE.mirT. pCCL.sin.cPPT.polyA.CTE.eGFP.minhCMV.hPGK.deltaNGFR.Wpre para crear pCCL.sin.cPPT.polyA.CTE.mirT.eGFP.minhCMV.hPGK.deltaNGFR.Wpre. La preparación a gran escala de ADN se llevó a cabo utilizando el sistema maxi preparación del plásmido de elevada pureza libre de endotoxinas de Marlingen Biosciences.

Producción y titulación del vector

5 Los LVs de tercera generación pseudotipados de VSV se produjeron como se describe por la cotransfección transitoria de cuatro plásmidos en las células 293T y se purificaron mediante ultracentrifugación (De Palma y Naldini, 2002). El título de expresión de GFP se estimó en células 293T por dilución limitante. Las partículas de vector se midieron por la inmunocaptura del antígeno p24 de gag del VIH-1 (NEN Life Science Products). El título de expresión del vector concentrado osciló entre $0,15-1,5 \times 10^{10}$ unidades^{293T} transducidas (UT)/ml para todos los vectores.

10 Cultivos celulares

10 Las células 293T se mantuvieron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Sigma) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (SFB; Gibco) y una combinación de penicilina-estreptomina y glutamina. La línea celular de monocitos U937 se mantuvo en RPMI suplementado como se ha indicado previamente (RPMI completo). Los cultivos primarios de células dendríticas humanas se aislaron de la sangre periférica como se ha descrito previamente y se mantuvieron en RPMI completo suplementado con GM-CSF e IL-4 (Bender *et al.*, 1996).

15 Extracción de ADN y ARN

20 Se extrajo ADN a partir de células y tejidos utilizando el "Midi kit de extracción de ADN a partir de sangre y cultivo celular" (Qiagen, Hilden, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Se extrajo ARN de las células utilizando "reactivo Tri" (Sigma, San Luis, Missouri), según las instrucciones del fabricante.

Membrana de Northern

25 La membrana de Northern se llevó a cabo como se ha descrito previamente (De Palma y Naldini, 2002). Se cargaron veinte microgramos de ARN total y se utilizaron 100 ng de la sonda de GFP etiquetada con ³²P.

Cuantificación del número de copias del vector

30 Se cuantificó el vector C/G mediante PCR en tiempo real, a partir de 100 ng de plantilla de ADN extraído de tejidos de ratón o 200 ng de plantilla de ADN extraído de líneas celulares. Los conjuntos de cebadores y sondas utilizados para el análisis son los siguientes:

35 Estructura del LV: 750 nmol de cebador directo (F): 5'TGAAAGCGAAAGGGAAACCA3, 200 nmol de cebador inverso (R): 5'-CCGTGCGCGCTTCAG-3', 200 nmol de sonda (P): 5'-VIC-CTCTCTCGACGCAGGACT-MGB-3'; ADN genómico murino: β-actina: 300nmol F: 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 750 nmol R: 5'CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3', 200nmol P: 5'-VIC-CACTGCCGCATCCTCTTCCCTCCC-MGB-3'; ADN genómico humano: hTERT: 200nmol F: 5'-GGCACACGTGGCTTTTCG-3', 600 nmol R: 5'-GGTGAACCTCGTAAGTTTATGCAA-3', 200nmol P: 5'-6FAM-TCAGGACGTGAGTGGACACGGTG-TAMRA-3'.

40 Se utilizaron diluciones en serie de las curvas convencionales de ADN de un ratón transgénico o una línea celular humana con una serie de integraciones de LV conocidas (determinadas por membrana de Southern). Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Se calculó C/G por: (ng de LV/ng de ADN endógeno) X (n.º de integraciones de LV en la curva convencional).

45 Análisis de la Expresión Génica

50 La transcripción inversa se llevó a cabo en 2 µg de ARN total utilizando el protocolo de hexámeros aleatorios del sistema de síntesis Superscript III First-Strand de RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó un análisis por PCR cuantitativa para cuantificar la concentración de ARNm de GFP, y la expresión de GAPDH se utilizó para la normalización. Se utilizaron dos conjuntos de cebadores y sonda:

55 Para GFP, 20X ensayo a demanda (Applied Biosystems), F: 5'-CAGCTCGCCGACCACTA-3', R: 5'-GGGCCGTGCGCGAT-3' y P: 5'-6FAM-CCAGCAGAACACCCCC-MGB-3', y para GAPDH: 200 nmol F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCACT-3', 900 nmol R: 5'GGCCATCACGCCACAGSTT-3' y 200 nmol P: 5'-TET-CCACCCAGAAGACTGTGGATGGCC-TAMRA-3'.

60 Las reacciones se realizaron por triplicado en un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems).

Análisis de la expresión de miARN

65 La detección de miARN se llevó a cabo utilizando el sistema de ensayo de microARN de Taqman de Applied Biosystems según las instrucciones del fabricante. Los resultados se normalizaron para has-mir-16 y let-7a se utilizó como calibrador. Los valores se expresan con relación a la expresión de let-7a.

Citometría de flujo

Se cultivaron células 293T transducidas durante al menos 14 días antes del análisis por FACS para alcanzar un estado constante de la expresión de GFP y descartar la pseudotransducción. Antes del análisis por FACS, las células adherentes se separaron con tripsina-EDTA al 0,05 %, se lavaron y se volvieron a suspender en TFS que contenía SFB al 2 %. Las células cultivadas en suspensión se lavaron y se volvieron a suspender en TFS que contenía SFB al 2 %. Para la inmunotinción, se bloquearon 10^5 células en TFS, suero humano al 5 %, SFB al 2 % durante 15 min a 4 °C. Después del bloqueo, se añadieron anticuerpos conjugados con R-ficoeritrina (RPE) (anti- Δ LNGFR o anti-CD45, BD Pharmingen, San Diego, CA) y las células se incubaron durante 30 min a 4 °C, se lavaron y se analizaron por citometría de flujo de dos colores en un Beckman Coulter Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Miami, FL).

Administración *in vivo* del vector

Se adquirieron ratones desnudos y Balb/c de 6-8 semanas de vida de Charles Rivers Laboratories (Milán, Italia) y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. Los ratones con hemofilia B (inactivación del factor IX de la coagulación) se adquirieron en el Instituto Salk (La Jolla, CA) y se criaron y mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. La administración del vector se llevó a cabo por inyección en la vena de la cola de los ratones. Todos los procedimientos con animales se realizaron según los protocolos aprobados por el Comité institucional de Uso y Cuidado Animal del hospital San Raffaele.

Transgénesis

Los ratones transgénicos se generaron utilizando LVs como se ha descrito (Lois *et al.*, 2002). En pocas palabras, los ratones FVB hembra se superovularon con una combinación de suero de yegua preñada y gonadotropina coriónica humana. En promedio, se recogieron entre 20 y 30 embriones por hembra y se microinyectaron en el espacio perivitelino con 10-100 pl de 5×10^7 UT/ml de soluciones concentradas de LV en el mismo día. Los embriones manipulados se implantaron inmediatamente en el oviducto de ratones CD1 pseudopreñados. Las crías se genotiparon para la presencia de la secuencia de GFP por PCR. Los ratones positivos se criaron para ensayar la transmisión de la línea germinal del transgén. Se extrajo ADN de la cola y se utilizó para cuantificar el número de copias del vector por PCR en tiempo real en los ratones fundadores y de progenie F1.

Inmunohistoquímica

Para la inmunofluorescencia, los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4 %, se equilibraron en sacarosa al 20 % en TFS durante 48 horas a 4 °C, se incrustaron en la temperatura óptima de corte (TOC) y se congelaron. Las secciones del criostato (5 μ m de grosor) se fijaron posteriormente con paraformaldehído, se bloquearon en suero de cabra al 5 % (Vector Laboratories, Burlingame, CA), en seroalbúmina bovina al 1 % (SAB), en Triton al 0,1 % en TFS y se incubaron con anticuerpos de rata anti-ratón F4/80 (Serotec, Raleigh, NC) o anti-ratón CD45, CD31 o CD8 (BD Pharmingen). Las señales fluorescentes de las secciones ópticas individuales se adquirieron por 3 microscopios láser confocales (Radiance 2100; Bio-Rad, Hercules, CA).

Cuantificación del factor IX (hFIX)

La concentración de hFIX se determinó en plasma citratado de ratón mediante un ensayo inmunoenzimático para el factor IX:Ag (Roche, Milán, Italia), y para la actividad de FIX mediante el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), como se ha descrito previamente (Brown *et al.*, 2004b).

Resultados

Con el fin de crear un sistema de vector de integración con el perfil de expresión desorientado selectivamente, se aprovechó el sistema de silenciamiento post-transcripcional mediado por miARN recientemente identificado. Se construyó un vector lentiviral (LV) regulado por miARN insertando cuatro copias en tándem de una secuencia de 23 pb (mirT) con una complementariedad perfecta para mir-30a, mir-142-5p o mir-142-3p en la región no traducida 3' (3'UTR) de un casete de expresión de GFP impulsado por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) expresada ubicuamente (Fig. 1a). Este diseño, al utilizar múltiples copias de una diana perfectamente complementaria, pretende optimizar la represión del transgén en presencia del miARN, y se basa en un entendimiento emergente de las normas que rigen la regulación mediada por miARN (Bartel y Chen, 2004; Doench *et al.*, 2003). Se seleccionaron mir-142-5p y mir-142-3p por informes recientes, utilizando membrana de Northern y análisis de micromatrices, indicando que estos miARNs se enriquecen en células hematopoyéticas (Baskerville y Bartel, 2005; Chen *et al.*, 2004). Se confirmó estos hallazgos previos mediante la realización del análisis de PCR cuantitativa en tiempo real para determinar la concentración de miARNs específicos en nuestras células diana (Figura 2a). Como se muestra en la Figura 2a, mir-142-3p y mir-142-5p se expresan altamente en células U937, pero solo se detectan a niveles bajos en células 293T. Se descubrió que mir-30a era bajo tanto en las células 293T como U937, y por consiguiente se utiliza como un control para nuestros estudios.

Los vectores se prepararon y se concentraron como se ha descrito previamente. La titulación del LV regulado por miARN indicó que la inclusión de la secuencia diana no afectó negativamente a la infectividad del vector o a los niveles de expresión transgénica en células no hematopoyéticas (Figura 2b). Se obtuvieron niveles de transducción y expresión transgénica comparables al vector original sin la secuencia diana de miARN (LV.PGK.GFP). En cambio, la transducción tanto de la línea celular de monocitos U937 humanos o las células dendríticas primarias humanas dio lugar a perfiles de expresión drásticamente diferentes entre los dos vectores, LV.PGK.GFP y LV.PGK.GFP.142-3pT. En las células U937, la intensidad media de fluorescencia era 50-100 veces mayor en células transducidas con LV.PGK.GFP a pesar de que el análisis de Taqman reveló copias similares del vector por genoma (C/G). También se observó un hallazgo similar en las células dendríticas, en el que incluso después de la transducción en una concentración elevada del vector (>50 MOI), se produjo una supresión casi completa de la expresión transgénica en las células que reciben al vector LV.PGK.GFP.142-3pT. Como control del vector, la secuencia diana de mir-30a se clonó en LV.PGK.GFP para crear LV.PGK.GFP.mir-30aT. mir-30a no se expresa en las células hematopoyéticas (Zeng *et al.*, 2002), y, como era de esperar, no se vio reducción alguna en la expresión de GFP tras la transducción celular. Por consiguiente, nuestros resultados demuestran claramente que en las células humanas nuestro diseño del vector mantiene una alta infectividad del vector, mientras previene al mismo tiempo la expresión génica en tipos celulares particulares.

Se describió previamente un sistema de vector que aprovechó la actividad bidireccional de un único elemento promotor para expresar de forma coordinada dos transcripciones distintas (Amendola *et al.*, 2005). Este sistema permite que dos transgenes se expresen en una célula tras la transducción con un único vector. Si bien este sistema es útil para muchas aplicaciones de terapia génica, también hay circunstancias en las que puede ser necesario expresar solamente uno de los dos transgenes. Desafortunadamente, no existe un sistema de transferencia génica disponible en la actualidad que permita la regulación divergente de dos transgenes de un único vector.

Con el fin de desarrollar un sistema de vector regulado de forma divergente, se modificó un LV bidireccional (Bd.LV) para incluir el mir-142-3pT en la 3'UTR del casete indicador de GFP (Fig. 1b). Este vector explota la actividad bidireccional intrínseca del promotor PGK para impulsar la transcripción divergente de dos transgenes. La transducción de las células 293T no reveló diferencias en GFP o en la expresión del receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso (Δ LNGFR) entre Bd.LV con o sin el mirT (Fig. 2c). Sin embargo, en los monocitos transducidos, el Bd.LV sin el mirT expresa tanto GFP como Δ LNGFR, mientras que el vector etiquetado solo expresó Δ LNGFR. Esto indica que la represión del transgén etiquetado se está produciendo a nivel post-transcripcional, y no por el silenciamiento transcripcional, ya que el silenciamiento del promotor habría impedido la expresión de ambos transgenes. Estos resultados también demuestran la utilidad de nuestra estrategia de regulación por miARN, en combinación con el sistema del vector bidireccional, para proporcionar un diseño del vector, que puede utilizarse de forma divergente para regular dos transgenes de un único vector.

Para demostrar aún más la versatilidad de este enfoque, se seleccionó un grupo de miARNs en función de su expresión diferencial en las células 293T y U937 (Figura 2a) y se clonaron las secuencias diana de estos miARNs en el casete de expresión de GFP del vector Bd.LV. Como se muestra en la Figura 2d., la transducción de las dos poblaciones de células reveló patrones de expresión muy diversos entre cada uno de los vectores. De manera importante, la concentración del miARN, según se determinó por PCR en tiempo real, mostró una fuerte correlación con el grado de supresión observado. Por ejemplo, la expresión de GFP de 218T.GFP.mCMV.PGK. Δ LNGFR se redujo más de 10 veces en células 293T, pero se observó poca o ninguna supresión en las células U937, en el que mir-218 se expresa solo a niveles bajos. Por consiguiente, estos datos extienden la utilidad potencial de nuestro enfoque a otros miARNs, y demuestran que el perfil de expresión puede proporcionar un medio simple para concebir un sistema de vector con un patrón de expresión tisular deseado.

Puesto que se sabe poco acerca de la solidez de la actividad de miARN, se propuso determinar si existía un umbral de regulación que podría superarse aumentando las copias del vector que transportan mirTs en las células diana. Tras múltiples series de transducción de células U937 solo se produjo un aumento gradual en la expresión transgénica, que se relacionó linealmente con el vector C/G (Fig. 3d). Estos resultados indican que la supresión se mantuvo en la misma medida para todas las dosis del vector ensayadas, y que la saturación no se alcanza incluso en el vector 175 C/G. Se preguntó a continuación si expresar secuencias exógenas que transportan mirTs podría suprimir el miARN endógeno de sus dianas naturales. Debido a que no se han identificado ARNm para mir-142-3p, se sobrecargó células con un segundo vector que transporta el mismo mirT en un casete de expresión diferente. Las células U937 que transportan 4 C/G de LV.PGK.GFP.142-3pT se superinfectaron con LV.PGK. Δ LNGFR.142-3pT, y como se muestra en la Figura 3e, incluso después de la introducción de 30 copias de un nuevo vector, no se produjo un aumento en la expresión de GFP. Además, la expresión de Δ LNGFR se suprimió por mir-142-3p (Fig. 3e). En general, nuestros datos sugieren que mir-142-3p no se limita en la reacción en la vía de interferencia de ARN, y que la introducción de nuevo material genético, que contiene el mir-142-3pT, no debe perturbar la actividad natural de este miARN.

La novedad de la estrategia de regulación de miARN proporciona la posibilidad de desarrollar por ingeniería genética vectores de manera que antes no era posible. Además de su utilidad para la prevención de la expresión en células hematopoyéticas, se deseó utilizar la regulación de miARN para evitar selectivamente la expresión transgénica en células productoras de vector. Normalmente, durante el proceso de producción de vectores, además de la expresión

del genoma del vector del plásmido de transferencia, también persiste la expresión transgénica. En el caso de vectores codificantes de moléculas tóxicas, esto puede ser particularmente problemático, ya que la expresión de la proteína tóxica mata las células productoras y conlleva una reducción total en el título del vector. Por consiguiente, la capacidad de prevenir selectivamente la expresión transgénica en células productoras sería un gran avance para la producción de vectores específicos, tales como los que codifican moléculas tóxicas.

Nuestros datos de perfiles de miARN revelaron que mir-19a se expresa altamente en células 293T. Se ha demostrado previamente que este miARN se asocia con el cáncer, pero no se encuentra en el tejido normal, y puede ser la causa de su alta expresión en líneas celulares transformadas y tumorales. Se razonó que la inclusión de la secuencia de mir-19aT impediría la expresión transgénica en las células 293T productoras. A fin de no disminuir el título del vector, se construyó el vector de modo que el casete de expresión, incluyendo la secuencia de 19aT, se encontraría en antisentido. En esta configuración, el genoma del vector puede transcribirse, y debido a que la secuencia de 19aT se encuentra en orientación antisentido, el transcrito no se someterá a la degradación de ARNi mediado por mir-19a.

Como se muestra en la Figura 4, tras la transfección transitoria de 293T, se produjo una reducción de más de 100 y 10 veces en la expresión de GFP entre pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas, pLV.PGK.GFP y pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas, respectivamente. Por consiguiente, se indica que la inclusión de la secuencia de mir-19aT puede prevenir la expresión génica en células 293T. Es importante destacar que, a diferencia de pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas, lo que resultó en una reducción de 10 veces en el título del vector en comparación con el plásmido canónico, que se debe al antisentido afectivo de transcritos complementarios producidos por el plásmido, pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas no produjo un vector con el título más bajo que el constructo de pLV.PGK.GFP. Por consiguiente, nuestros datos demuestran que la regulación de miARN puede utilizarse para prevenir la expresión de un transgén durante la producción de vectores sin afectar negativamente al título del vector.

Siguiendo la caracterización *in vitro* de nuestro LV regulado por miARN en las células humanas, se amplió nuestros estudios en el ratón. Los ratones expresan homólogos exactos de cada uno de los miARNs humanos que se ensayó *in vitro*, aunque no se han establecido sus patrones de expresión tisular *in situ* (Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Se administraron 2×10^8 partículas de LV a ratones desnudos. El análisis por PCR cuantitativa (Q-PCR) del bazo y el hígado reveló el contenido del vector similar para todos los grupos de tratamiento (los datos no se muestran). Sin embargo, los perfiles de expresión difieren dramáticamente. Los animales tratados con LV.PGK.GFP y LV.PGK.GFP.30aT mostraron un patrón generalizado de expresión celular en el hígado, incluyendo células de Kupffer, hepatocitos y células endoteliales (Fig. 5a). En cambio, los animales tratados con LV.PGK.GFP.142-3pT presentaban una expresión de GFP casi indetectable en las células de Kupffer, pero mantuvo altos niveles de GFP en los hepatocitos y las células endoteliales.

Se observaron hallazgos consistentes en el bazo de los animales tratados. En los ratones que recibieron el vector LV.PGK.GFP había una alta frecuencia de esplenocitos GFP+ (> 5 %), con fuertes niveles de expresión, como se indica por el análisis por FACS (Fig. 5c). En comparación, menos del 1 % de los esplenocitos de los animales tratados con LV.PGK.GFP.142-3pT eran GFP+ y solo a baja intensidad. El análisis inmunohistoquímico de estos ratones reveló que la presencia de células GFP+ se encuentra casi exclusivamente en la zona marginal. Estas células no tenían linaje hematopoyético, como se indica por la cotinción negativa para el marcador CD45 pan-leucocitario (Fig. 5b), pero eran probablemente fibroblastos reticulares (Steiniger *et al.*, 2003), parte del estroma de soporte del bazo. Esto demuestra un aspecto novedoso de este enfoque, en el que la expresión génica puede mantenerse en una amplia variedad de tipos celulares, mientras restringe al mismo tiempo la expresión de un linaje celular particular.

Para una mejor caracterización del perfil de expresión de nuestro vector, y por consecuencia, la actividad reguladora de mir-142-3p, se generaron ratones transgénicos utilizando el vector LV.PGK.GFP.142-3pT. Se analizó la sangre periférica de la progenie F1 que transporta un intervalo del vector C/G (de 4 a 24), y la expresión de GFP era prácticamente indetectable en todos los linajes hematopoyéticos (n=26; Fig. 6a). Además, a pesar de la fluorescencia brillante pan-celular durante el parénquima del hígado, intestino y pulmón, así como la arquitectura estromal del bazo, el timo y la médula ósea, no se observó expresión alguna de GFP en las células de linaje hematopoyético de estos órganos (Fig. 6b). Estos resultados demuestran que mir-142-3p endógeno restringe brusca y robustamente la expresión transgénica a partir de linajes hematopoyéticos.

Por último, se evaluó la utilidad de nuestro LV regulado por miARN para la transferencia génica sistémica en ratones Balb/c adultos inmunocompetentes. Se administraron 5×10^8 unidades de transducción (UT)/ratón de LV.PGK.GFP, LV.PGK.GFP.142-3pT o un LV que expresa GFP bajo el control del promotor de la albúmina (LV.ALB.GFP). Se analizaron ratones en varios tiempos para la expresión de GFP, un neo-antígeno fuerte (Stripecke *et al.*, 1999), en el bazo e hígado. En los ratones tratados con LV.PGK.GFP, se detectaron células de GFP+ en el día 5, pero coherentes con nuestros hallazgos previos (Follenzi *et al.*, 2004), durante el día 14 se observaron pocas o ninguna células de GFP+ y el contenido del vector había disminuido a niveles casi indetectables (Fig. 7a). La eliminación de células de GFP+ también se produjo con LV.ALB.GFP, a pesar de que la expresión se limita predominantemente a los hepatocitos. Sin embargo, cabe destacar, que se detectó la expresión inespecífica de este vector en el bazo,

incluyéndose en una pequeña fracción de las células hematopoyéticas, y puede haber tenido un papel en el inicio de la eliminación del vector mediado por mecanismos inmunitarios (Fig. 7d).

5 A diferencia de nuestros hallazgos con LV.PGK.GFP y LV.ALB.GFP, los hepatocitos de GFP+ y las células endoteliales se presentaron con alta frecuencia en el hígado de todos los ratones tratados con LV.PGK.GFP.142-3pT en todos los intervalos de tiempo analizados (> 120 días, Fig. 7a,b). El análisis morfométrico indicó que entre el 10 y 20 % de los hepatocitos eran GFP+ (n=10), y de manera importante, la frecuencia de células positivas permaneció estable. El vector C/G era inicialmente similar a todos los grupos de tratamiento, pero durante el día 14 disminuyó rápidamente en ratones con LV.PGK.GFP y LV.ALB.GFP, y se mantuvo a niveles muy detectables en animales tratados con LV.PGK.GFP.142-3pT. Se observó una lenta disminución en C/G en el seguimiento más duradero, pero debido a que esta disminución no coincidió con una disminución en los hepatocitos de GFP+, era probablemente debido a la sustitución de las células de Kupffer transducidas durante el recambio de células hematopoyéticas normales.

15 A pesar de una amplia expresión de GFP en el hígado, no se detectaron células de Kupffer de GFP+. Además, mientras se observaron fibroblastos reticulares de GFP+ en la zona marginal del bazo, no se detectó la expresión transgénica en las células de linaje hematopoyético. De acuerdo con la expresión de GFP sostenida, no se observó una infiltración CD8+ significativa o signos de patología en el hígado (Fig. 7c).

20 Como muestra adicional de la utilidad de nuestro enfoque para el establecimiento de la expresión transgénica a largo plazo, se establece utilizar nuestro sistema para el tratamiento de la hemofilia B. Los ratones con hemofilia B son completamente carentes de FIX de coagulación, y, como tal, tienen < 1 % de actividad normal de coagulación. Además, puesto que no expresan FIX de forma natural, son altamente propensos a desarrollar inmunidad anti-FIX, después de la introducción de antígenos de FIX. Para evitar este problema, muchos grupos, incluido el nuestro, han construido vectores de expresión de FIX específicos de hepatocitos, con el fin de evitar la expresión génica en APCs, y evitar la inducción de la inmunidad anti-FIX (Brown *et al.*, 2004a; Brown *et al.*, 2004b; Follenzi *et al.*, 2004; Mingozzi *et al.*, 2003). Sin embargo, como se muestra en la Figura 8, el vector de LV.ET.hFIX específico de hepatocitos fue incapaz de proporcionar la expresión de FIX a largo plazo en ratones con hemofilia B después de la administración intravenosa. En cambio, la inyección del vector de LV.ET.hFIX.142-3pT, que contenía la secuencia de mir-142-3pT en la 3'UTR del casete de expresión de FIX, dio lugar a la expresión de FIX a largo plazo, y restauró la actividad de coagulación a > 40 % de los niveles normales.

En general, estos resultados indican que el uso de la expresión estable a alto nivel de un de LV regulado por miARN de un neo-antígeno, ya sea intracelular o extracelular, puede establecerse con éxito en ratones inmunocompetentes, e incluso puede utilizarse para corregir el fenotipo de una enfermedad, como se ha demostrado en los ratones con hemofilia B.

En este caso, se describe el primer sistema de transferencia génica viral, que explota la maquinaria de miARN endógeno para la regulación transgénica. Mediante el uso de la administración mediada por LV, la transferencia génica *in vivo* era posible, y, como tal, se proporciona algunos de los primeros datos *in situ* de la actividad de miARN en un mamífero adulto. Al igual que en los estudios en los metazoos inferiores (Brennecke *et al.*, 2005; Reinhart *et al.*, 2000), se observó que la regulación de miARN era extremadamente eficaz. En ratones transgénicos, así como en ratones administrados con LV por vía intravenosa, se observó actividad de mir-142-3p consistente en todas las células hematopoyéticas. Mediante la adición de la secuencia de mir-142-3pT a un transgén, se produjo una reducción de hasta 100 veces en la expresión transgénica en los linajes hematopoyéticos, sin efecto sobre la expresión en células no hematopoyéticas.

En nuestro sistema, la regulación de miARN endógeno proporcionó un mejor medio para prevenir la expresión del vector en células de linaje hematopoyético después del uso del promotor de la albúmina específico de hepatocitos. Esto se produjo probablemente ya que la regulación post-transcripcional puede superar la expresión inespecífica debido a los efectos posicionales de inserción y/o reconstitución imperfecta de un promotor específico de tejido. Este fenómeno puede ser similar a una de las funciones naturales propuestas de la regulación de miARN, que se utiliza para prevenir la traducción de los ARNms que se transcribieron en un estado celular previo o que surgen debido a la transcripción parcial (Bartel y Chen, 2004; Farh *et al.*, 2005). Como tal, la incorporación de la regulación de miARN en un vector puede proporcionar una importante capa de control sobre la expresión transgénica, tanto si se utiliza con los promotores ubicuos o en conjunción con elementos de transcripción específicos de tejido.

Mediante el uso de la regulación de miARN para desorientar selectivamente la expresión transgénica de linajes hematopoyéticos, se fue capaz de prevenir la eliminación del vector mediada por el sistema inmunitario y permitir la transferencia génica estable, superando de esta manera una de las barreras más significativas para la terapia génica clínica (Thomas *et al.*, 2003). De particular relevancia, se demuestra la utilidad de este enfoque de antígenos circulantes tanto intracelulares como extracelulares. Utilizando la estrategia de regulación de miARN, se fue capaz de alcanzar niveles estables y elevados de corrección del fenotipo de coagulación de ratones con hemofilia B. Según nuestro conocimiento, este es la primera demostración de una aplicación terapéutica para explotar la regulación de miARN endógeno.

Los estudios descritos en este caso también proporcionan la primera prueba cuya regulación mediada por miARN es un medio robusto y altamente eficaz que aboga prácticamente la expresión de un promotor del vector fuerte, constitutivamente activo, o incluso para mejorar el rendimiento de un promotor específico de tejido. En general, resulta evidente en este trabajo que los miARNs pueden proporcionar una poderosa manera de regular un transgén, y mediante la utilización de esta red compleja, se fue pionero en un nuevo paradigma en el diseño del vector que presenta importantes implicaciones para la transferencia génica terapéutica.

A través de nuestro enfoque, que permite disposiciones de miR combinatorias, pueden crearse numerosos constructos de administración génica, utilizados *in vitro* o *in vivo*, para la terapia génica o para la transgénesis animal, para lograr patrones sofisticados de la expresión génica, incluyendo la capacidad para regular de forma divergente dos transgenes diferentes. A medida que se intenta descubrir nuevos miARNs específicos de tejido, así como específicos en el desarrollo y en el tumor, será posible construir vectores que son de forma condicional sensibles al crecimiento o a la diferenciación e incluso a la tumorigénesis.

Se incorporan en el presente documento por referencia, cada una de las solicitudes y patentes mencionadas en el presente documento, y cada documento citado o mencionado en cada una de las solicitudes y patentes previas, incluidas durante la tramitación de cada una de las solicitudes y patentes ("documentos citados en la solicitud") y cualquier instrucción o catálogo del fabricante de cualquier producto citado o mencionado en cada una de las solicitudes y patentes y en cualquier documento citado en la solicitud. Es más, se incorporan en el presente documento por referencia todos los documentos citados en el presente texto, y todos los documentos citados o mencionados en los documentos citados en el presente texto, y cualquier instrucción o catálogo del fabricante de cualquier producto citado o mencionado en el presente texto.

Referencias

Amendola, M., Venneri, M. A., Biffi, A., Vigna, E., y Naldini, L. (2005). *Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters*. Nat Biotechnol 23, 108-116.

Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., et al. (2004). *MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues*. Genome Res 14, 2486-2494.

Bartel, D. P., y Chen, C. Z. (2004). *Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs*. Nat Rev Genet 5, 396-400.

Baskerville, S., y Bartel, D. P. (2005). *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. Rna 11, 241-247.

Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M., y Bhardwaj, N. (1996). *Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood*. J Immunol Methods 196, 121-135.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., y Cohen, S. M. (2005). *Principles of microRNA-target recognition*. PLoS Biol 3, e85.

Brown, B. D., y Lillicrap, D. (2002). *Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy*. Blood 100, 1133-1140.

Brown, B. D., Shi, C. X., Powell, S., Hurlbut, D., Graham, F. L., y Lillicrap, D. (2004a). *Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A*. Blood 103, 804-810.

Brown, B. D., Shi, C. X., Rawle, F. E., Tinlin, S., McKinven, A., Hough, C., Graham, F. L., y Lillicrap, D. (2004b). *Factors influencing therapeutic efficacy and the host immune response to helper-dependent adenoviral gene therapy in hemophilia A mice*. J Thromb Haemost 2, 111-118.

Calin, G. A., Liu, C. G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., et al. (2004a). *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 11755-11760.

Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., y Croce, C. M. (2004b). *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 101, 2999-3004.

Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F., y Bartel, D. P. (2004). *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science 303, 83-86.

- Chen, C. Z., y Lodish, H. F. (2005). *MicroRNA as regulators of mammalian hematopoiesis*. *Semin Immunol* 17, 155-165.
- 5 De Geest, B. R., Van Linthout, S. A., y Collen, D. (2003). *Humoral immune response in mice against a circulating antigen induced by adenoviral transfer is strictly dependent on expression in antigen-presenting cells*. *Blood* 101, 2551-2556.
- 10 De Palma, M., Montini, E., de Sio, F. R., Benedicenti, F., Gentile, A., Medico, E., y Naldini, L. (2005). *Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells*. *Blood* 105, 2307-2315.
- 15 De Palma, M., y Naldini, L. (2002). *Transduction of a gene expression cassette using advanced generation lentiviral vectors*. *Methods Enzymol* 346, 514-529.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., y Sharp, P. A. (2003). *siRNAs can function as miRNAs*. *Genes Dev* 17, 438-442.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., y Bartel, D. P. (2005). *The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution*. *Science* 310, 1817-1821.
- 20 Follenzi, A., Battaglia, M., Lombardo, A., Annoni, A., Roncarolo, M. G., y Naldini, L. (2004). *Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice*. *Blood* 103, 3700-3709.
- 25 Follenzi, A., Sabatino, G., Lombardo, A., Boccaccio, C., y Naldini, L. (2002). *Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors*. *Hum Gene Ther* 13, 243-260.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., y Enright, A. J. (2006). *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. *Nucleic Acids Res* 34, D140-144.
- 30 He, L., y Hannon, G. J. (2004). *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet* 5, 522-531.
- Houbaviy, H. B., Murray, M. F., y Sharp, P. A. (2003). *Embryonic stem cell-specific MicroRNAs*. *Dev Cell* 5, 351-358.
- 35 Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., et al. (2005). *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. *Cancer Res* 65, 7065-7070.
- Kasashima, K., Sakota, E., y Kozu, T. (2004). *Discrimination of target by siRNA: designing of AML1-MTG8 fusion mRNA-specific siRNA sequences*. *Biochimie* 86, 713-721.
- 40 Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., y Tuschl, T. (2002). *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. *Curr Biol* 12, 735-739.
- 45 Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., y Baltimore, D. (2002). *Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors*. *Science* 295, 868-872.
- 50 Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., et al. (2004). *MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression*. *Nat Genet* 36, 1079-1083.
- Mingozzi, F., Liu, Y. L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J. H., Wang, Y., Arruda, V. R., High, K. A., y Herzog, R. W. (2003). *Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer*. *J Clin Invest* 111, 1347-1356.
- 55 Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., y Ruvkun, G. (2000). *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans**. *Nature* 403, 901-906.
- 60 Sandrin, V., Russell, S. J., y Cosset, F. L. (2003). *Targeting retroviral and lentiviral vectors*. *Curr Top Microbiol Immunol* 281, 137-178.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., y Ambros, V. (2004). *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. *Genome Biol* 5, R13.
- 65 Steiniger, B., Ruttiger, L., y Barth, P. J. (2003). *The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments*. *J Histochem Cytochem* 51, 655-664.

- Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S., y Kohn, D. (1999). *Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy*. *Gene Ther* 6, 1305-1312.
- 5 Thomas, C. E., Ehrhardt, A., y Kay, M. A. (2003). *Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy*. *Nat Rev Genet* 4, 346-358.
- Verma, I. M., y Weitzman, M. D. (2005). *GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine*. *Annu Rev Biochem* 74, 711-738.
- 10 Zeng, Y., Wagner, E. J., y Cullen, B. R. (2002). *Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells*. *Mol Cell* 9, 1327-1333.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector génico para su uso en terapia que comprende una secuencia diana de miARN y un transgén operativamente unido a dicha secuencia diana de miARN, en el que la secuencia diana de miARN sirve para prevenir o reducir la expresión del transgén en una célula que comprende un miARN endógeno correspondiente.
2. El vector génico para su uso según la reivindicación 1, en forma de un vector génico no viral.
- 10 3. El vector génico para su uso según la reivindicación 2, en el que el vector génico no viral comprende un vector o plásmido de expresión.
4. El vector génico para su uso según la reivindicación 1, en forma de un vector viral.
- 15 5. El vector génico para su uso según la reivindicación 4 que comprende el genoma (ARN o ADN) del vector viral, cuyo genoma comprende la secuencia diana de miARN.
6. El vector génico para su uso según la reivindicación 5 que comprende el genoma del vector viral, cuyo genoma comprende al menos un transgén operativamente unido a la secuencia diana de miARN.
- 20 7. El vector génico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el vector viral se selecciona entre el grupo de retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes simple, picornavirus, y alfavirus.
- 25 8. El vector génico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el vector viral puede obtenerse a partir de un lentivirus.
9. El vector génico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en el que el vector viral se encuentra en forma de una partícula de vector viral.
- 30 10. El vector génico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que la secuencia diana de miARN controla la expresión del vector viral en una célula diana.
- 35 11. El vector génico para su uso según cualquier reivindicación precedente que comprende más de una secuencia diana de miARN, que puede ser idéntica o diferente, en tándem y/o en orientaciones diferentes.
- 40 12. El vector génico para su uso según cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia diana de miARN es una secuencia dirigida por el miARN hsa-mir-142as (también llamado hsa-mir-142-3p), los miARN let-7a, mir-15a, mir-16, mir-17-5p, mir-19, mir-142-5p, mir-145 y/o mir-218.
- 45 13. El vector génico para su uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el transgén codifica los genes terapéuticos adecuados que incluyen aquellos que codifican proteínas supresoras tumorales, enzimas, enzimas activadoras de profármacos, moléculas inmunomoduladoras, anticuerpos, moléculas similares a inmunoglobulina modificadas, proteínas de fusión, hormonas, proteínas de membrana, proteínas o péptidos vasoactivos, citocinas, quimiocinas, proteínas antivirales, ARN antisentido y ribozimas.
- 50 14. Un vector génico para su uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el vector comprende un promotor específico de tejido.
15. Una composición farmacéutica para su uso en terapia que comprende el vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14.
- 55 16. Una célula para su uso en terapia infectada o transducida con el vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que dicha célula no es una célula embrionaria humana.
17. Una célula para su uso según la reivindicación 16 que es una célula madre hematopoyética, renal, neuronal, pulmonar, hepática, esplénica, cardíaca, tumoral o embrionaria.
- 60 18. Uso del vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 15 que comprende un transgén operativamente unido a la secuencia diana de miARN para la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer.
- 65 19. Uso del vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 15 que comprende un transgén operativamente unido a la secuencia diana de miARN para la fabricación de un medicamento para tratar la hemofilia.
20. Uso del vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición

farmacéutica como se define en la reivindicación 15 para la fabricación de un medicamento para prevenir el rechazo mediado por el sistema inmunitario del gen transferido.

5 21. Uso del vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 15 para la fabricación de un medicamento para prevenir la respuesta inmunitaria a un antígeno circulante.

10 22. Uso del vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 15 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada entre cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades hereditarias, enfermedades cardíacas, ictus, artritis, infecciones virales y enfermedades del sistema inmunitario.

15 23. Uso del vector génico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 15 para la fabricación de un medicamento para la terapia génica.

Figura 1.

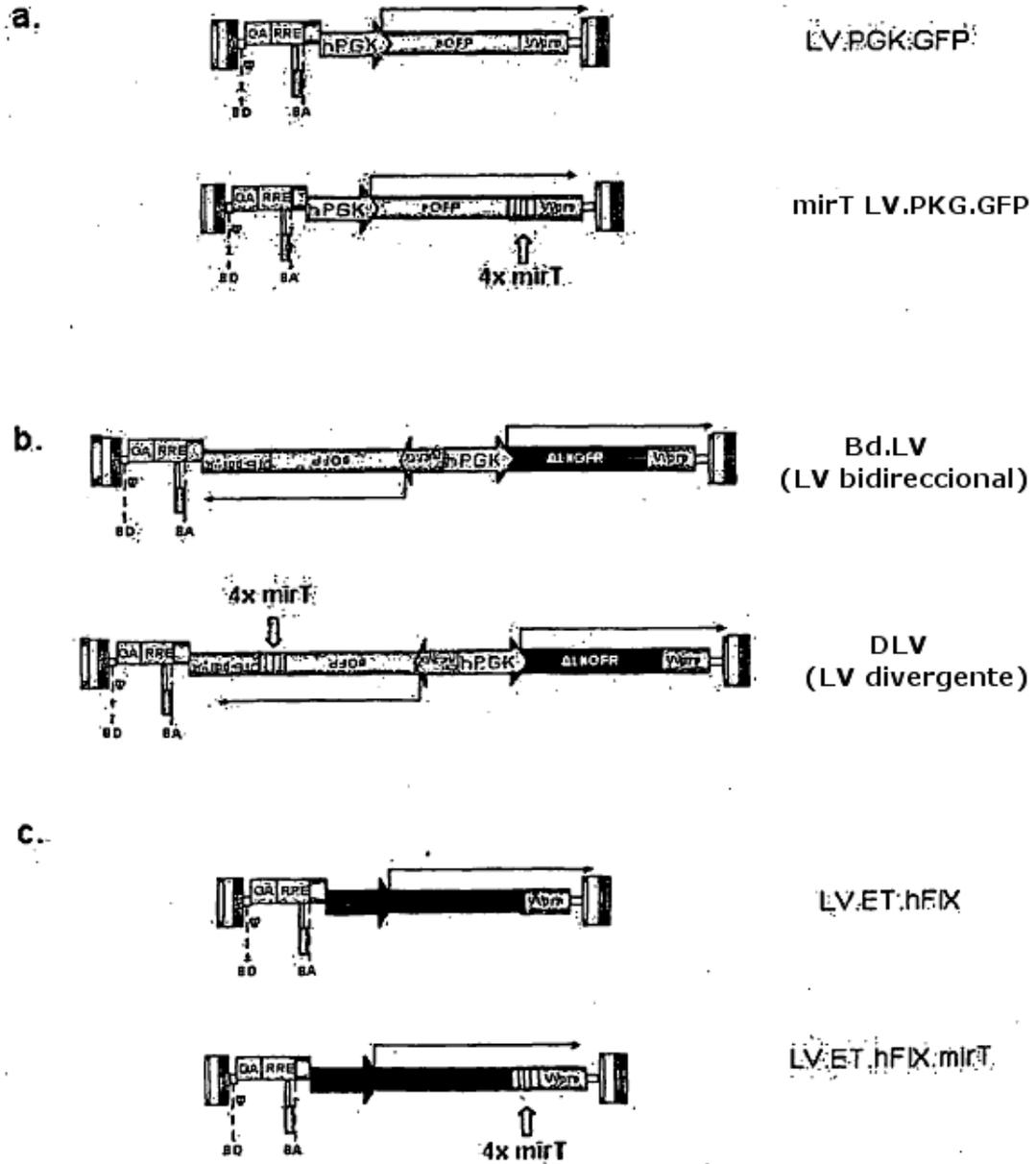


Figura 2.

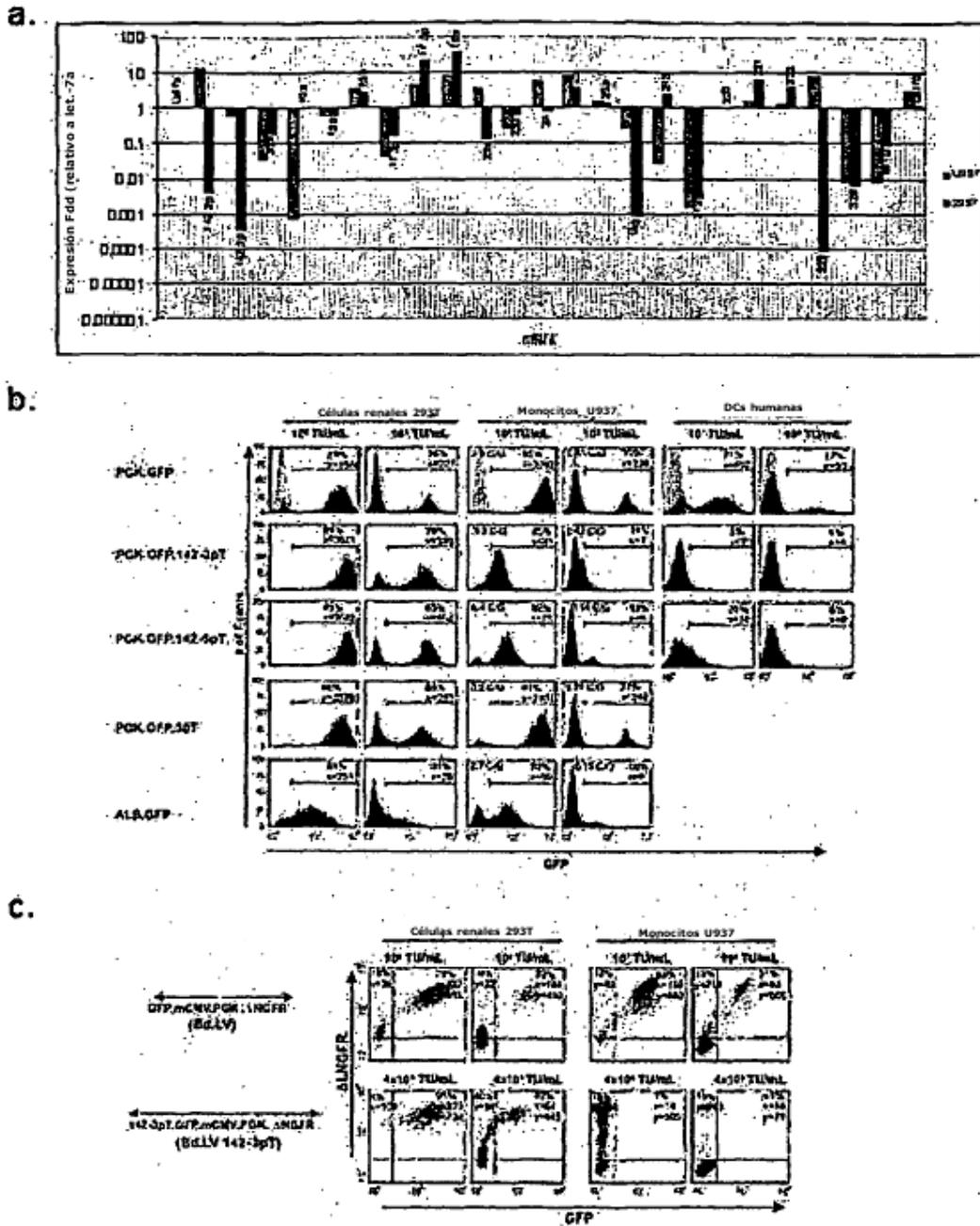


Figura 2.

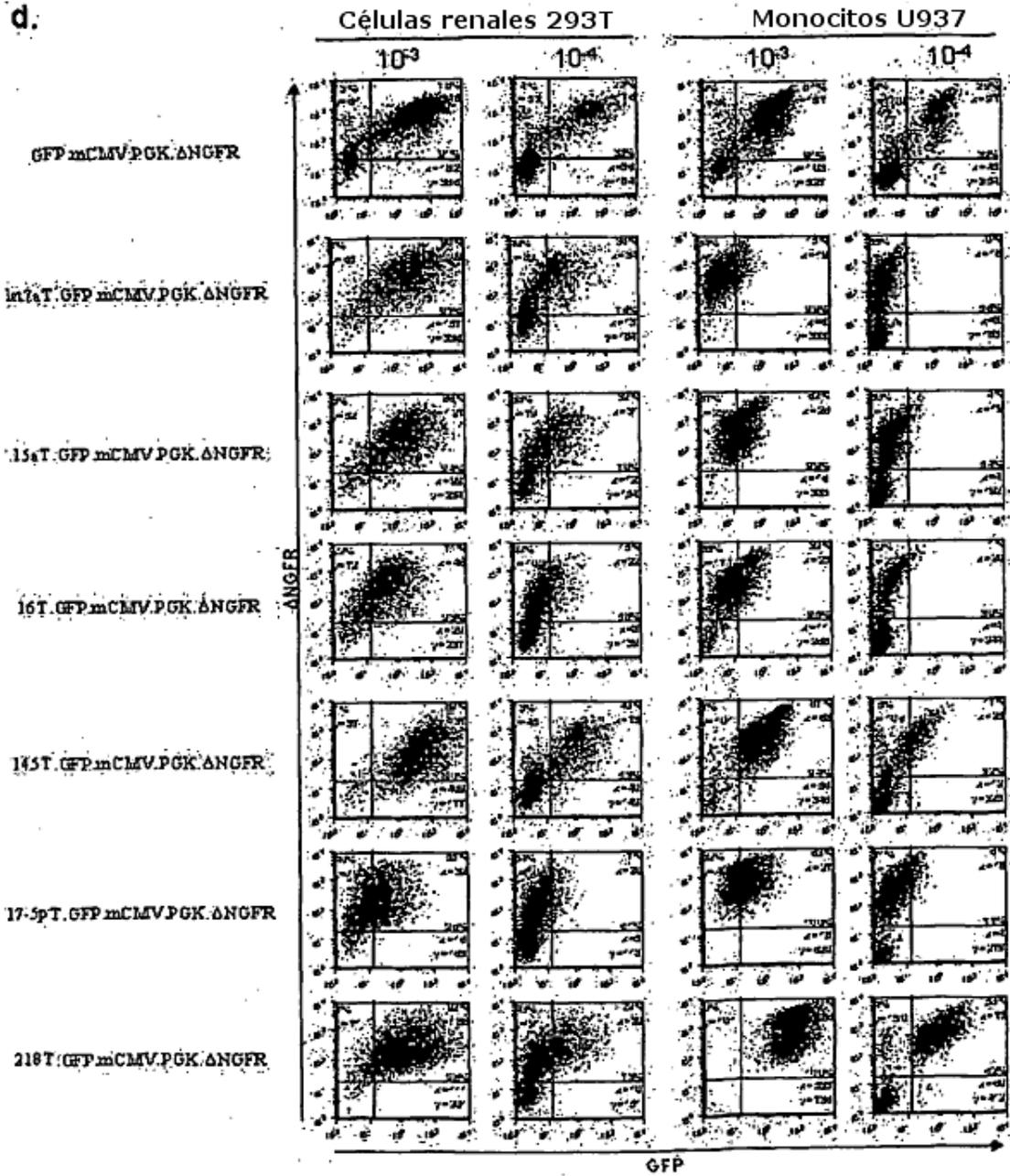


Figura 3.

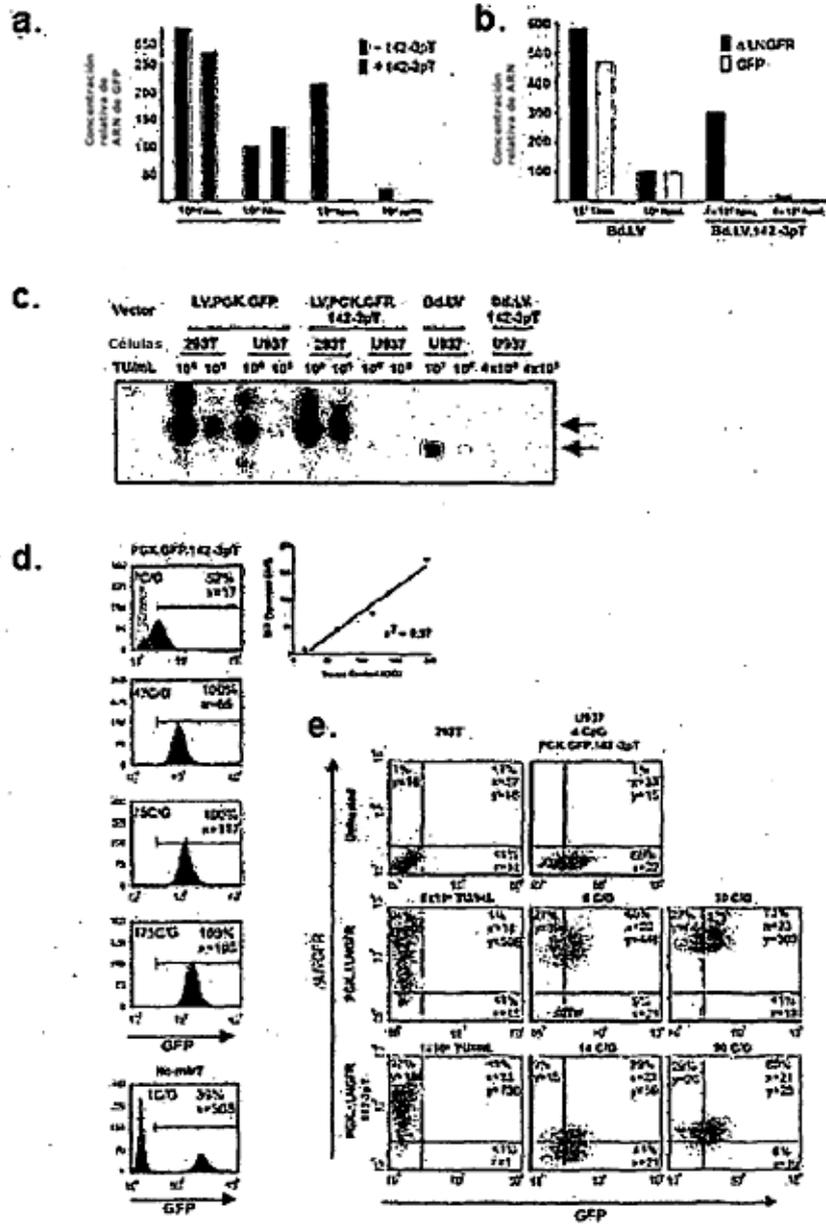


Figura 4.

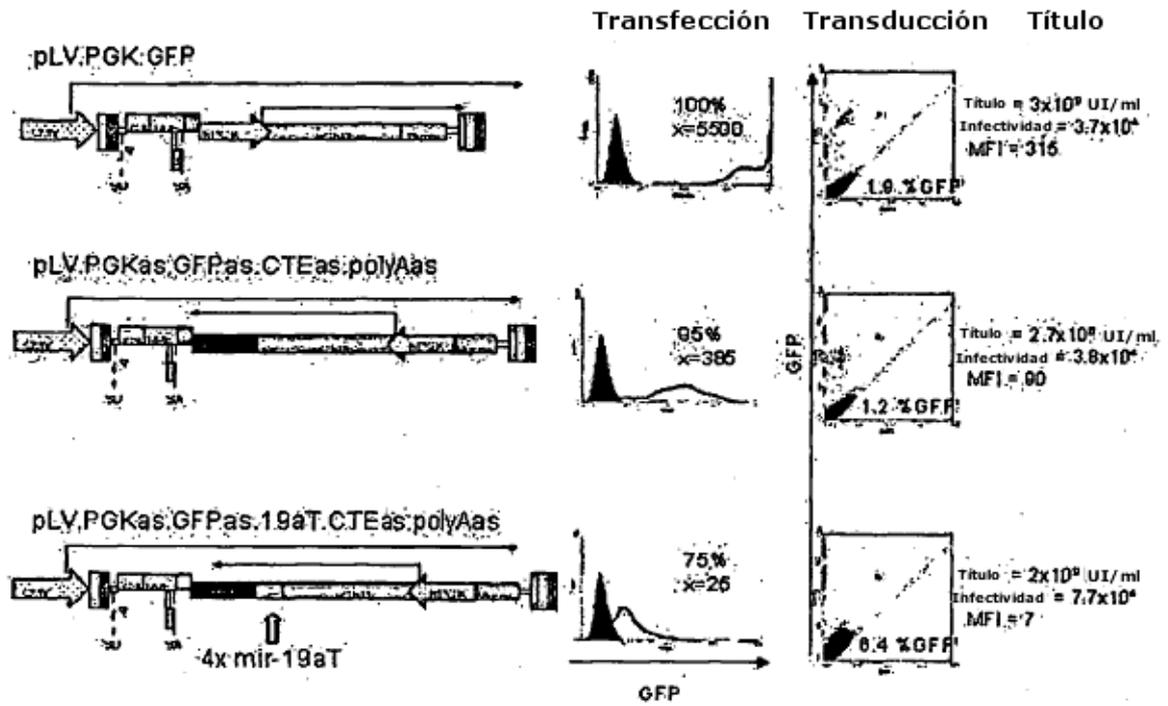


Figura 5.

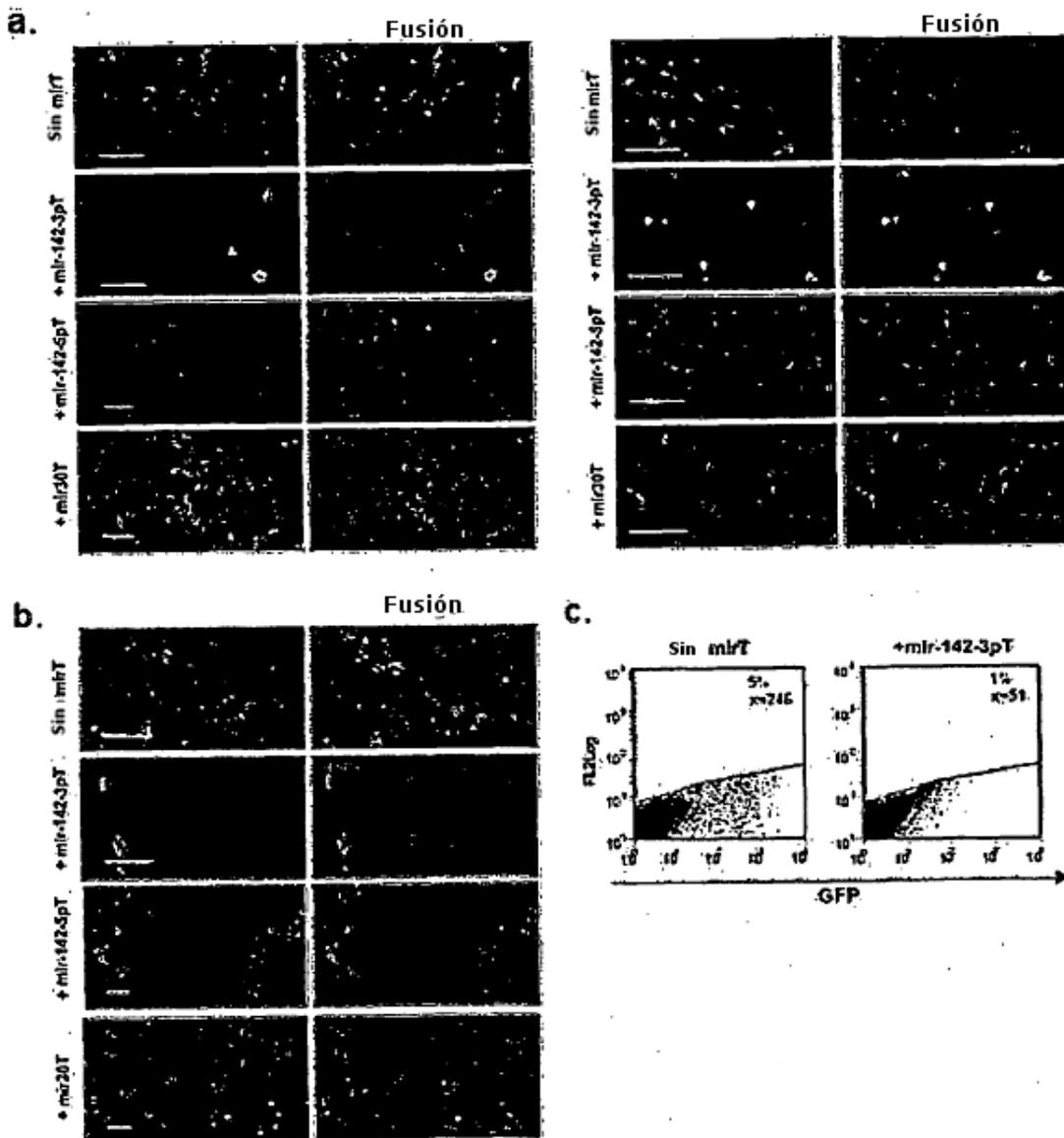


Figura 6

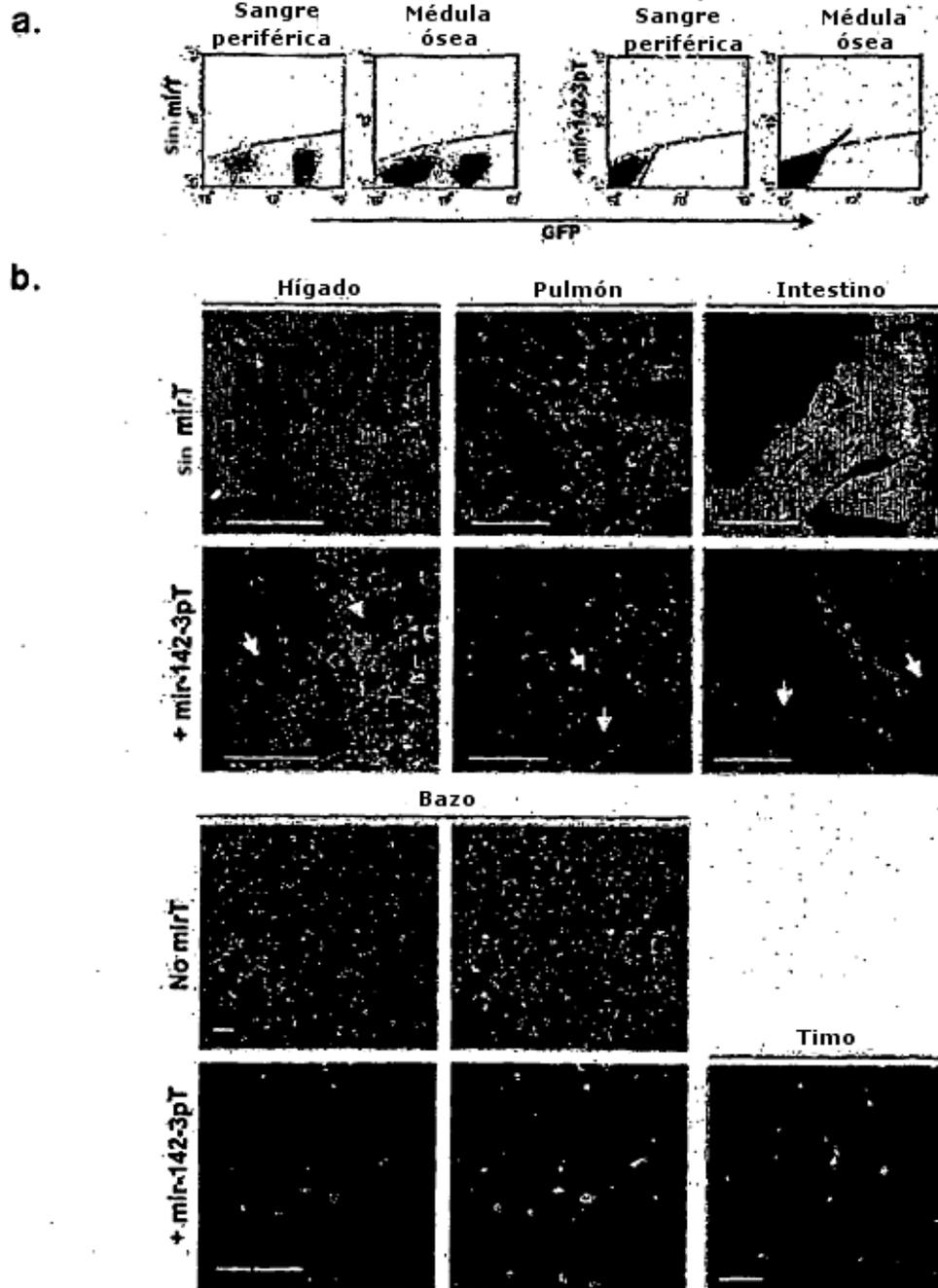


Figura 7.

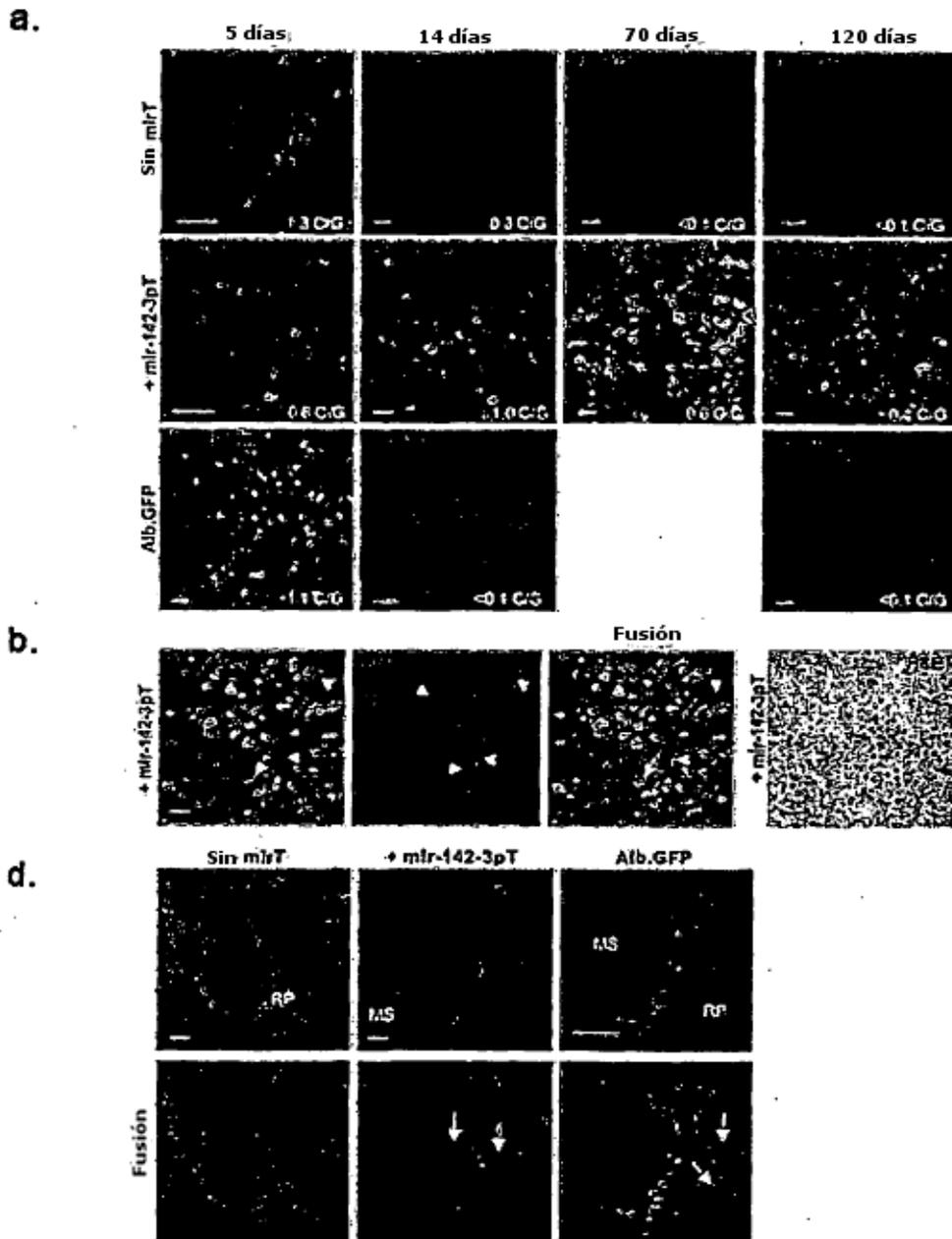


Figura 8.

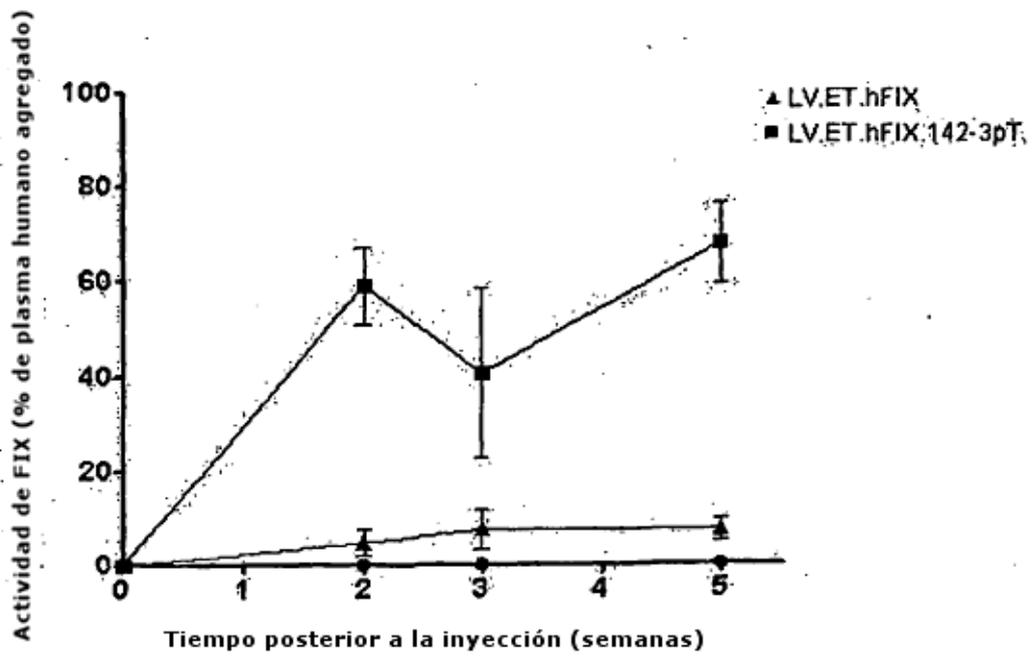
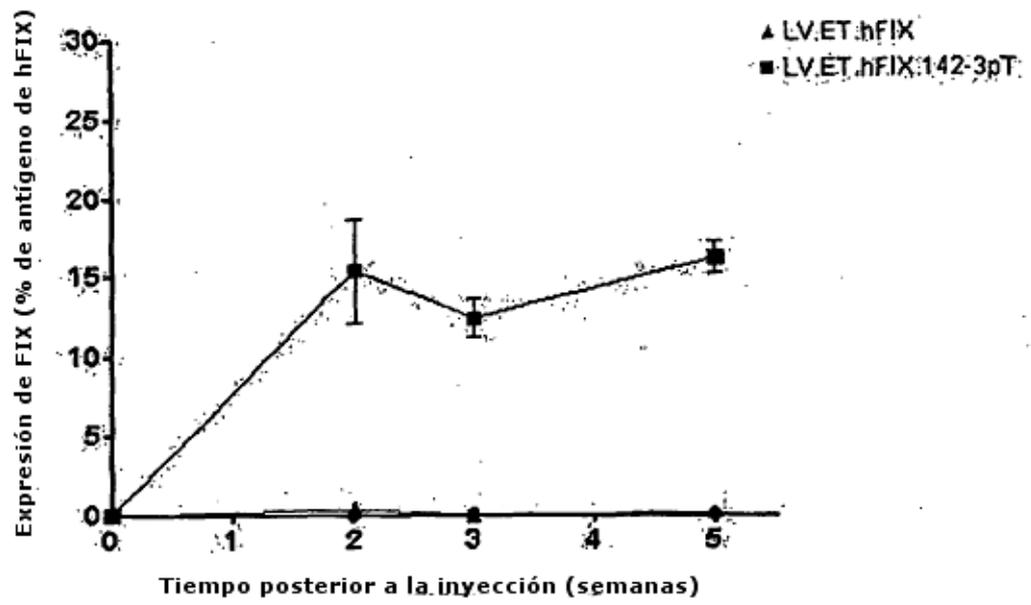
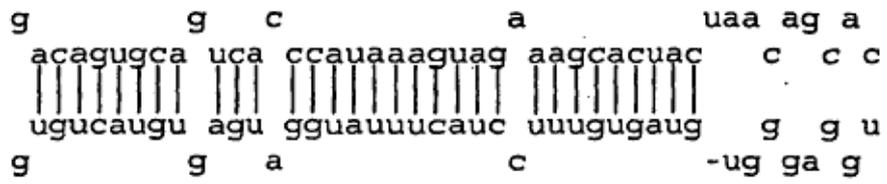


Figura 9

A. Secuencia horquilla de hsa-mir-142 maduro



**B. Diana de 1x.mir-142.as
TCCATAAAGTAGGAAACACTACA**