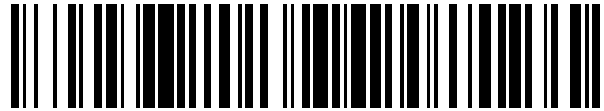


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 903**

21 Número de solicitud: 201530001

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**02.01.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.08.2016**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2015/070968**

71 Solicitantes:

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (100.0%)**

**Avda. de Monforte de Lemos, 5**

**28029 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**ALFRANCA GONZÁLEZ, Arantzazu y**

**GARCÍA CASTRO, Javier**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **VECTOR LENTIVIRAL DE EXPRESIÓN AUTOLIMITADA**

57 Resumen:

Vector lentiviral de expresión autolimitada.

La presente invención se refiere a un vector lentivírico bistrónico de expresión autolimitada, a un sistema de producción de dicho vector lentivírico así como a los usos de dicho vector en terapia, en particular en osteogénesis.

**ES 2 578 903 A1**

DESCRIPCIÓN

**VECTOR LENTIVIRAL DE EXPRESIÓN AUTOLIMITADA**

**Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un vector lentivírico bistrónico de expresión autolimitada, a un sistema de producción de dicho vector lentivírico así como a los usos de dicho vector en  
5 terapia, en particular en osteogénesis.

**Antecedentes de la invención**

Los sistemas de vector retrovírico, tales como los sistemas de vector lentivírico, se han propuesto como sistema de suministro/vehículos para la transferencia de un polinucleótido de interés a uno o más sitios diana. Es más, el concepto de uso de vectores víricos para terapia  
10 génica es bien conocido en el estado del arte (Verma y Somia (1997) Nature 389: 239-242). Sin embargo, la utilización de este tipo de sistemas en terapia génica podría entrañar una serie de riesgos para la salud, por lo que resulta crucial tener en cuenta la bioseguridad de este tipo de vectores antes de utilizarlos. En este sentido, existen dos pilares básicos ligados a la bioseguridad de este tipo de sistemas:

- 15 - Seguridad en cuanto a la capacidad infectiva del virus (a nivel de producción y de efecto en el huésped) y
- Seguridad en cuando a producción de efectos genotóxicos, posibilidad de aparición de procesos tumorales, etc.

En este sentido, con el objetivo de aumentar la bioseguridad de los vectores lentivirales que se  
20 utilizan habitualmente, se han seguido clásicamente tres estrategias fundamentales ligadas a los dos pilares arriba mencionados:

1. En primer lugar, se ha dividido la información genética del lentivirus en varias partes (3 ó 4 en función del sistema), de manera que para su producción se utilice un vector que contenga la información concerniente al gen de interés (*vector de transferencia*), y  
25 plásmidos accesorios que suministran la información necesaria para el empaquetamiento (*gag-pol-rev*) y la envuelta viral (*env*), dificultando al máximo que el virus se reconstituya espontáneamente;

2. En segundo lugar, se han eliminado de la estructura del virus original los genes que se relacionan con la patogenicidad del virus, incrementando además de esta manera su capacidad para empaquetar DNA heterólogo; y
3. En tercer lugar, se han eliminado del vector de transferencia parte de los elementos transcripcionales del VIH-1, de forma que se elimina una región suficientemente grande como para interrumpir la actividad transcripcional del LTR. De esta forma, la replicación de un vector lentiviral en las células transducidas queda imposibilitada.

Por otro lado, modificaciones en elementos reguladores heterólogos presentes en el vector de transferencia, tales como el empleo de promotores específicos de tejido o de actividad regulable, han sido también utilizados de forma habitual.

Sin embargo, a pesar de todas las estrategias utilizadas para incrementar el perfil de bioseguridad de este tipo de sistemas, dado el carácter integrativo de los vectores lentivirales en las células de mamífero, especialmente en células humanas, sigue existiendo la necesidad de conseguir nuevos sistemas de regulación que permitan eliminar el provirus del genoma de la célula diana una vez puesta en marcha la respuesta deseada, y hacerlo de forma regulada endógenamente, a partir de un mecanismo desencadenado por la expresión del transgén en cuestión.

### **Breve descripción de la invención**

La presente invención proporciona un nuevo sistema especialmente adecuado para su uso en un vector lentiviral bicistrónico que comprende un polinucleótido de interés dirigido por un promotor eucariota y la recombinasa Cre dirigida por un promotor activado por el producto de expresión del gen de interés, con el objeto de producir un control endógeno de la expresión dicho gen. El vector de la presente invención resulta especialmente útil para su aplicación en terapia génica, en particular para la producción de células madre mesenquimales (MSCs del inglés "Mesenchymal stem cells") modificadas para regeneración ósea.

### **Breve descripción de las figuras**

**Fig.1:** Diseño de los vectores lentivirales empleados en el estudio y estrategia de expresión autolimitada del transgén.

**Fig.2:** Vectores lentivirales empleados en el estudio y comportamiento esperado de su expresión en condiciones de diferenciación osteogénica.

**Fig.3:** Cambios morfológicos observados en MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-GFP (GFP) como control, y dos días después se comenzó a cultivarlas en medio de diferenciación osteogénica o control. Cinco días después de la transducción (tres días de diferenciación osteogénica) se observaron los cambios morfológicos presentes en las células en cada condición experimental. Las fotografías muestran campos representativos de cada cultivo, y en ellas se puede apreciar la presencia de células de apariencia redondeada en las MSCs transducidas con Dlx5-Cre, similares al cultivo control GFP con medio de diferenciación osteogénica (flechas). También se observa la morfología de aspecto fibroblastoide en las MSCs transducidas con Dlx5.

**Fig.4:** Cambios en el citoesqueleto de actina en MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-GFP (GFP) como control. Dos días después de la transducción se comenzó el proceso de diferenciación con medio osteogénico. Cinco días después de la transducción (tres de diferenciación osteogénica) el citoesqueleto de actina de dichas células fue teñido con faloidina-Texas Red. Las fotografías muestran campos representativos de los cultivos, donde se puede apreciar un incremento en la polimerización de actina en MSCs DLX5-Cre, que se dispone en muchos casos de forma perinuclear (flechas), mientras que en las MSCs DLX5 hay un incremento exacerbado de la polimerización de actina, que adopta una disposición en haces paralelos al eje longitudinal de las células (puntas de flecha).

**Fig.5:** Potencial osteogénico in vitro de las MSCs transducidas. Se llevó a cabo la transducción de MSCs con pWPI-PL-DLX5 (DLX5), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre), pWPI-PL-GFP (GFP) y pWPI-PL-GFP\_sCre (GFP-Cre). Dos días después de la transducción se comenzó el proceso de diferenciación con medio osteogénico durante doce días. Las células fueron teñidas entonces con Alizarin Red para poner de manifiesto la presencia de precipitados de calcio. Las fotografías muestran campos representativos de los cultivos, donde se puede apreciar la presencia de depósitos de calcio en condiciones basales tanto en MSCs DLX5 como en MSCs DLX5-Cre.

**Fig.6:** Cuantificación de la densidad mineral de los implantes subcutáneos con MSCs transducidas. Se transdujeron las MSCs con pWPI-PL-GFP (GFP), pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-DLX5 (DLX5), y fueron incluidas en implantes cerámicos, que se colocaron subcutáneamente en ratones NOD/SCID. En parte de los implantes GFP se añadió BMP-2 (GFP-BMP2) como control positivo de diferenciación. Tras doce días, los implantes se extrajeron y la densidad mineral de los mismos (BMD) se cuantificó con  $\mu$ CT. La gráfica en A. muestra la media  $\pm$ SD de BMD en los distintos implantes (n=3). En B. se representa la media  $\pm$  SD de BMD corregida con el porcentaje de hueso en cada implante (n=3). \*, p<0.05; \*\*\*, p<0.001.

**Fig.7:** Análisis histológico de los implantes con MSCs transducidas. Los implantes que contenía MSCs transducidas con pWPI-PL-GFP (GFP), control (C) o con BMP-2, pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre) y pWPI-PL-DLX5 (DLX5), fueron extraídos tras catorce días, procesados y teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Las fotos muestran campos representativos de los implantes, donde se aprecian zonas positivas para eosina sugerentes de osteoide (flechas). En el caso de los implantes con MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre (DLX5-Cre), se llevó a cabo una tinción con un anticuerpo anti-vimentina humana, que muestra la presencia en dichas zonas de las MSCs incluidas en los implantes.

### **Descripción detallada de la invención**

Para la presente invención se planteó la modificación de células madre mesenquimales (MSCs) para incrementar su potencial osteogénico. Para ello, se requería de un sistema de expresión destinado a incrementar dicho potencial osteogénico a través de la expresión de un gen que codificase para un mediador primario intracelular implicado en la diferenciación celular osteogénica que a su vez produjese un control endógeno de la expresión de dicho gen que contribuyera a mejorar la bioseguridad del proceso.

Con este objetivo, los inventores de la presente invención obtuvieron el vector pWPI-PL-DLX5\_sCre (ver figuras 1 y 2 así como el apartado de ejemplos donde se describe la estructura de este vector así como la producción del mismo). Este vector se caracteriza por tener una secuencia polinucleotídica que comprende:

- 5
- a. un polinucleótido de interés que codifica para la proteína DLX5 y un primer promotor eucariota, en concreto el promotor EF-1 $\alpha$ , que controla la expresión de dicho polinucleótido, y
  - b. un polinucleótido que codifica para la proteína CRE recombinasa y un segundo promotor eucariota, en el que el segundo promotor controla la expresión de la proteína Cre recombinasa y en el que el segundo promotor eucariota queda activado por un producto derivado de la expresión de la proteína DLX5, en concreto por la proteína Osterix, con lo que se produce un control endógeno de la expresión de dicha proteína.
- 10 Dicho vector se utilizó para transducir MSCs. Asimismo, MSCs adicionales a las ya transducidas con dicho vector fueron transducidas con un vector que únicamente expresaba la proteína DLX5 y no CRE para su utilización como control positivo. Ambos vectores dieron lugar *in vivo* a tejido óseo de características similares (tanto a nivel cuantitativo como cualitativo). Sin embargo, el potencial mayor de bioseguridad producido por el primer vector, así como el efecto
- 15 deletéreo de la sobreexpresión mantenida sobre las MSCs *in vitro* en el segundo, hacen del vector pWPI-PL-DLX5\_sCre una herramienta de partida ideal para el diseño de nuevas estrategias en el tratamiento de patologías que cursan con defectos óseos.

Adicionalmente, de los ensayos efectuados (ver ejemplos), se pueden extraer las siguientes conclusiones adicionales:

- 20
- La expresión transitoria de Dlx5 en MSCs es suficiente para inducir cambios morfológicos y la redistribución del citoesqueleto de actina similares a los que ocurren *in vitro* durante la diferenciación ósea con medio de cultivo específico, y diferentes a los obtenidos con la expresión mantenida del factor. En todos los casos se observa la aparición de depósitos de calcio en el cultivo, si bien en menor cuantía en el caso de

25 pWPI-PL-DLX5\_sCre.
  - Las MSCs modificadas con el vector control y pWPI-PL-DLX5\_sCre forman tejido óseo en implantes subcutáneos con igual eficiencia que MSCs control en presencia del factor osteogénico BMP-2.

- El vector pWPI-PL-DLX5\_sCre induce en MSCs una expresión de Dlx5 a niveles fisiológicos y de forma transitoria, de manera que potencialmente incrementa la seguridad del sistema.

Así, en la presente invención se ha demostrado como el vector pWPI-PL-DLX5\_sCre constituye una herramienta especialmente útil para el tratamiento de patologías que cursan con defectos óseos. Es más, el diseño de dicho vector constituye una herramienta de partida ideal para el diseño de nuevas estrategias en el tratamiento de todo tipo de patologías, en particular para aquellas que cursan con defectos potencialmente tratables con mediadores intracelulares preferiblemente implicados en la diferenciación celular. En este sentido, el vector pWPI-PL-DLX5\_sCre constituye un formidable punto de partida para conseguir nuevos sistemas de regulación que permitan eliminar el provirus del genoma de la célula diana una vez puesta en marcha la respuesta deseada, y hacerlo de forma regulada endógenamente, a partir de un mecanismo desencadenado por la expresión del transgén en cuestión.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una secuencia polinucleotídica que comprende:

- a. un polinucleótido de interés que codifica para un mediador primario intracelular y un primer promotor eucariota, en el que el primer promotor eucariota controla la expresión de dicho polinucleótido de interés, y
- b. un polinucleótido que codifica para la proteína CRE recombinasa y un segundo promotor eucariota, en el que el segundo promotor controla la expresión de la proteína Cre recombinasa y en el que el segundo promotor eucariota queda activado por un producto de expresión del polinucleótido de interés del paso a) con lo que se produce un control endógeno de la expresión de dicho polinucleótido, y

donde por mediador primario intracelular se entiende el codificado de forma directa por el polinucleótido de interés, donde por producto de expresión se entiende un mediador secundario intracelular, donde por mediador secundario intracelular se entiende un mediador sintetizado por una célula diana como consecuencia del proceso puesto en marcha por la expresión del mediador primario y donde por segundo promotor se entiende un promotor específico de respuesta al mediador secundario intracelular; y

donde opcionalmente dicha secuencia polinucleotídica resulta adecuada para su uso en un vector viral integrativo, preferiblemente lentiviral, que comprende la presencia de dos regiones LoxP flanqueando el provirus tras su integración.

5 Se hace notar que el término promotor tal y como se refiere éste al primer promotor, es bien conocido en la materia y se usa en el sentido normal de la materia, por ejemplo, como sitio de unión de ARN polimerasa. El término engloba regiones de ácido nucleico en el intervalo de tamaño y complejidad desde promotores mínimos hasta promotores que incluyen elementos en 5' y potenciadores.

10 El primer promotor se selecciona típicamente de promotores que son funcionales en células de mamífero, aunque pueden usarse promotores funcionales en otras células eucarióticas. El promotor deriva típicamente de secuencias promotoras de genes eucarióticos. Por ejemplo, puede ser un promotor derivado del genoma de una célula en que va a ocurrir la expresión o pueden ser promotores que funcionen de manera ubicua (tales como los promotores de  $\alpha$ -actina, -actina o tubulina) o, como alternativa, de manera específica de tejido.

15 El nivel de expresión de una o varias secuencias nucleotídicas bajo el control del promotor pueden modularse manipulando la región promotora. Por ejemplo, diferentes dominios en una región promotora pueden poseer diferentes actividades reguladoras génicas. Los papeles de estas diferentes regiones se evalúan típicamente usando constructos de vector que tienen diferentes variantes del promotor con regiones específicas modificadas.

20 En el contexto de la presente invención, la proteína CRE recombinasa presenta las siguientes secuencias aminoacídicas y nucleotídicas consenso:

- Sec. nucleotídica: AB449974.1
- Sec. aminoacídica: YP\_006472.1

25 Otras secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína CRE recombinasa funcional quedarían también abarcadas por la presente invención. Asimismo, otras secuencias aminoacídicas de la proteína CRE recombinasa funcional también quedan abarcadas por la presente invención. En el contexto de la presente invención se entiende por otras secuencias aminoacídicas aquellas secuencias funcionales que presenten un grado de identidad con la



secuencia consenso arriba mencionada superior al 85%, preferiblemente superior al 90, 95, 96, 97, 98 o 99%.

5 En el contexto de la presente invención, por Cre funcional se entiende la enzima capaz de llevar a cabo procesos de recombinación de ADN mediante el reconocimiento de secuencias específicas en el ADN denominadas sitios LoxP.

10 En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la secuencia polinucleotídica es un casete de expresión adecuado para su uso en un vector viral, preferiblemente en un vector lentiviral. En el contexto de la presente invención por “casete de expresión” se entiende el conjunto de secuencias codificantes y reguladoras destinadas a la expresión de uno o más transgenes.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un vector, preferiblemente a un vector viral que comprende la secuencia polinucleotídica del primer aspecto de la invención o el casete de expresión anteriormente mencionado.

15 En el contexto de la presente invención por vector se entiende una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un entorno a otro. De acuerdo con la presente invención, y a modo de ejemplo, algunos vectores usados en técnicas de ADN recombinante 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 hospedadora. Ejemplos de  
20 vectores usados en técnicas de ADN recombinante incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, cromosomas, cromosomas artificiales o virus o cualquier modificación de cualquiera de estos vectores.

El término “vector” incluye vectores de expresión y/o vectores de transformación.

25 El término “vector de expresión” significa un constructo capaz de expresión *in vivo* o *in vitro/ex vivo*.

El término “vector de transformación” significa un constructo capaz de transferencia de una especie a otra.

Por vector lentivírico se entiende un vector vírico capaz de transducir una célula diana de forma independiente de la división celular. Los vectores lentivíricos son parte de un grupo mayor de vectores denominados vectores retrovíricos.

5 El polinucleótido de la presente invención puede suministrarse a un sitio diana mediante un vector vírico o no vírico.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el vector viral es un vector lentivírico recombinante, preferiblemente un vector lentivirico bicistrónico de expresión autolimitada recombinante, donde preferiblemente, dicho vector lentivírico comprende un elemento regulador post-transcripcional.

10 Preferiblemente, el vector lentivírico de la presente invención tiene un genoma vírico mínimo.

Como se usa en la presente memoria, el término “genoma vírico mínimo” significa que el vector lentivírico se ha manipulado para retirar los elementos no esenciales y para retener los elementos esenciales para proporcionar la funcionalidad necesaria para infectar y suministrar una secuencia nucleotídica de interés a una célula hospedadora diana.

15 Los lentivirus pertenecen a la familia de los retrovirus, pero pueden infectar tanto a células en división como no en división (Lewis et al. (1992) EMBO J. 3053-3058). Durante el proceso de infección, un retrovirus se enlaza inicialmente con un receptor de superficie celular específico. Con la entrada en la célula hospedadora sensible, el genoma de ARN retrovírico se copia entonces a ADN por la transcriptasa inversa codificada víricamente portada dentro del virus  
20 original. Se transporta este ADN al núcleo de la célula hospedadora, donde se integra posteriormente en el genoma del hospedador. En esta etapa, se hace referencia al lentivirus típicamente como provirus. El provirus es estable en el cromosoma hospedador durante la división celular y se transcribe como otros genes celulares. El provirus codifica las proteínas y demás factores requeridos para replicarse.

25 Cada genoma retrovírico, incluyendo los lentivirus, comprende los genes llamados gag, pol y env, que codifican proteínas y enzimas del virión. Estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración y transcripción províricas. Sirven también como secuencias potenciadoras/promotoras. En otras palabras, las LTR pueden controlar la expresión de los

genes víricos. La encapsidación de ARN lentivíricos ocurre a causa de una secuencia psi localizada en el extremo 5' del genoma vírico.

Las LTR son secuencias idénticas que pueden dividirse en tres elementos, que se llaman U3, R y U5. U3 deriva de la secuencia única del extremo 3' del ARN. R deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 deriva de la secuencia única del extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes retrovirus.

Con respecto a los genes estructurales gag, pol y env, gag codifica para la proteína estructural interna del virus. La proteína Gag se procesa proteolíticamente a las proteínas maduras MA (matriz), CA (cápsida) y NC (nucleocápsida). El gen pol codifica la transcriptasa inversa (RT), que contiene ADN polimerasa, ARNasa H asociada e integrasa (IN), que median la replicación del genoma. El gen env codifica la glucoproteína de superficie (SU) y la proteína transmembrana (TM) del virión, que forman un complejo que interacciona específicamente con proteínas receptoras celulares. Esta interacción conduce en última instancia a la infección por fusión de la membrana vírica con la membrana celular.

Los lentivirus pueden contener genes "adicionales" que codifican proteínas distintas de gag, pol y env. Ejemplos de genes adicionales incluyen, en VIH, uno o más de vif, vpr, vpx, vpu, tat, rev y nef. EIAV tiene (entre otros) el gen adicional S2.

Las proteínas codificadas por los genes adicionales sirven para diversas funciones. En EIAV, por ejemplo, tat actúa como activador transcripcional de la LTR vírica. Se une a una estructura secundaria de ARN de horquilla estable designada como TAR. Rev regula y coordina la expresión de genes víricos mediante elementos de respuesta a rev (RRE). Los mecanismos de acción de estas dos proteínas se cree que son ampliamente similares a los mecanismos análogos en los virus de primates. La función de S2 es desconocida. Además, se ha identificado una proteína de EIAV, Ttm, que está codificada por el primer exón de tat cortado y empalmado con la secuencia de codificación de env al inicio de la proteína transmembrana.

El grupo de lentivirus puede dividirse en "lentivirus de primate" y "lentivirus no de primate". Ejemplos de lentivirus de primate incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA), y el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). El grupo lentivírico no de primate incluye el prototipo de "virus lento" virus visna/maedi (VMV), así como el virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV)

relacionado, el virus de anemia infecciosa equina (EIAV) y los virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) .

En el estado del arte se pueden encontrar detalles sobre la estructura genómica de algunos lentivirus. A modo de ejemplo, pueden encontrarse detalles sobre VIH y EIAV en la base de  
5 datos NCBI Genbank (concretamente, nº de acceso a genoma AF033819 y AF033820, respectivamente). Pueden encontrarse también detalles de las variantes de VIH en <http://hiv-web.lanl.gov>. Pueden encontrarse detalles de las variantes de EIAV en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Los vectores lentivíricos de la invención incluirán vectores lentivíricos de primate tales como  
10 vectores de VIH (por ejemplo, vectores de VIH-1 y VIH-2) y vectores de SIV, y vectores lentivíricos no de primate.

Por otro lado, los vectores lentivíricos de la presente invención son vectores lentivíricos recombinantes.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “vector lentivírico recombinante” (RLV)  
15 hace referencia a un vector con suficiente información genética para permitir el empaquetamiento de un genoma de ARN, en presencia de componentes de empaquetamiento, en una partícula vírica capaz de infectar y transducir una célula diana. La infección y transducción de una célula diana incluyen la transcripción inversa e integración en el genoma de la célula diana. El RLV porta secuencias de codificación no víricas que se van a suministrar  
20 por el vector a la célula diana.

Por tanto, en una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el vector vírico es un vector lentivírico bicistrónico de expresión autolimitada recombinante capaz de transducir una célula diana e integrarse en el ADN genómico de dicha célula dando lugar a un provirus, que comprende:

- 25 a. El conjunto de secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas y demás factores requeridos implicados en la regulación postranscripcional, así como en el empaquetamiento del virus, donde dichas secuencias se seleccionan de la lista que consiste en: RRE: (Rev Response Element); cPPT: (central Polypurine Track) y WPRE: (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory  
30 Element) y opcionalmente la proteína Psi,

- b. un cistrón que comprende un polinucleótido de interés que codifica para un mediador primario intracelular, preferiblemente implicado en la diferenciación celular, y un primer promotor eucariota, en el que el primer promotor eucariota controla la expresión de dicho polinucleótido de interés,
- 5 c. un segundo cistrón que comprende un polinucleótido que codifica para la proteína Cre recombinasa y un segundo promotor eucariota, en el que el segundo promotor controla la expresión de la proteína Cre recombinasa y en el que el segundo promotor eucariota queda activado por un producto de expresión del polinucleótido de interés del paso a) con lo que se produce un control
- 10 endógeno de la expresión de dicho gen, y
- d. donde dicho vector comprende la presencia de dos regiones LoxP flanqueando el provirus tras la integración del DNA en la célula diana,

donde por mediador primario intracelular se entiende el codificado de forma directa por el polinucleótido de interés, donde por producto de expresión se entiende un mediador secundario

15 intracelular, preferiblemente implicado en la diferenciación celular, donde por mediador secundario intracelular, preferiblemente implicado en la diferenciación celular, se entiende un mediador sintetizado por una célula diana como consecuencia del proceso puesto en marcha por la expresión del mediador primario y donde por segundo promotor se entiende un promotor específico de respuesta al mediador secundario intracelular.

20 En el contexto de la presente invención, el término RRE presenta la siguiente secuencia nucleotídica consenso:

5'AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGC  
GTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCCAGCAGC  
25 AGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTC  
TGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGA  
TCAACAGCTCCT 3'

Otras secuencias nucleotídicas correspondientes a un RRE funcional quedarían también

30 abarcadas por la presente invención. En el contexto de la presente invención se entiende por otras secuencias nucleotídicas aquellas secuencias funcionales que presenten un grado de

identidad con la secuencia consenso arriba mencionada superior al 85%, preferiblemente superior al 90, 95, 96, 97, 98 o 99%.

Tal y como se usa en la presente invención, por RRE funcional se entiende un elemento de respuesta a la proteína Rev, que participa en la exportación del ARN viral desde el núcleo hasta el citoplasma de la célula huésped.

En el contexto de la presente invención, el término cPPT presenta la siguiente secuencia nucleotídica consenso:

5'AAAAGAAAAGGGGGGA 3'

Otras secuencias nucleotídicas correspondientes a un cPPT funcional quedarían también abarcadas por la presente invención. En el contexto de la presente invención se entiende por otras secuencias nucleotídicas aquellas secuencias funcionales que presenten un grado de identidad con la secuencia consenso arriba mencionada superior al 85%, preferiblemente superior al 90, 95, 96, 97, 98 o 99%.

Tal y como se usa en la presente invención, por cPPT funcional se entiende secuencia responsable de la importación del genoma viral al núcleo de la célula huésped.

En el contexto de la presente invención, el término WPRE presenta la siguiente secuencia nucleotídica consenso:

5'TCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATGTTGCTCCTT  
TTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCT  
TTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTT  
GTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGC  
ATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGG  
CGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACT  
GACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTG  
CCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG  
ACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCC  
CTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGG 3'

30

Otras secuencias nucleotídicas que correspondientes a un WPRE funcional quedarían también abarcadas por la presente invención. En el contexto de la presente invención se entiende por otras secuencias nucleotídicas aquellas secuencias funcionales que presenten un grado de identidad con la secuencia consenso arriba mencionada superior al 85%, preferiblemente superior al 90, 95, 96, 97, 98 o 99%.

Tal y como se usa en la presente invención, por WPRE funcional se entiende secuencia que facilita la maduración del ARN, incrementando la expresión del transgén en la célula diana.

En el contexto de la presente invención, el término Psi (Secuencia necesaria para empaquetar el RNA viral en la cápside del virus) presenta la siguiente secuencia nucleotídica consenso:

5'TGAGTACGCCAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAG 3'

Otras secuencias nucleotídicas correspondientes a la proteína Psi quedarían también abarcadas por la presente invención. En el contexto de la presente invención se entiende por otras secuencias nucleotídicas aquellas secuencias funcionales que presenten un grado de identidad con la secuencia consenso arriba mencionada superior al 85%, preferiblemente superior al 90, 95, 96, 97, 98 o 99%.

Mediadores primarios y secundarios útiles en la presente invención, pero que en ningún caso limitan la presente invención, son:

1. Para diferenciación osteogénica: TAZ, Smads, beta catenina, C/EBP beta, DLX5, RUNX2, ATF4, Fra1, NFAT, Osterix (promotores de osteopontina, fosfatasa alcalina, osteocalcina, colágeno I, Satb2);
2. Para diferenciación adipogénica: PPAR gamma, C/EBP alfa;
3. Para diferenciación condrogénica: SOX9, Runx2/MEF2c (promotores de colágeno II, colágeno X, agregano, MMP13);
4. Para diferenciación miogénica: MYF 5, PAX.

En el contexto de la presente invención, por vector de expresión autolimitada se entiende aquél que contiene elementos que permiten eliminar el provirus del genoma de la célula diana de forma regulada endógenamente, mediante la acción de un mediador secundario sintetizado por la célula diana en respuesta a la expresión del polinucleótido de interés.

En el contexto de la presente invención, por mediadores intracelulares implicados en la diferenciación osteogénica se entiende moléculas intracelulares que participan de forma secuencial en el conjunto de fenómenos biológicos sucesivos que median la transformación de MSCs en osteocitos. Ejemplos de dichos mediadores son: Smads, DLX5, RUNX2, Osterix, ATF4, Fra1, NFAT.

En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención, los mediadores intracelulares primarios y secundarios implicados en la diferenciación son mediadores intracelulares implicados en la diferenciación osteogénica, donde preferiblemente dichos mediadores son respectivamente DLX5 y Osterix.

En el contexto de la presente invención, el término DLX5 presenta las siguientes secuencias aminoacídicas y nucleotídicas consenso:

- Sec. Nucleotídica: NM\_005221
- Sec. Proteica: NP\_005212.1

Otras secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína DLX5 funcional quedarían también abarcadas por la presente invención. Asimismo, otras secuencias aminoacídicas de la proteína DLX5 funcional también quedan abarcadas por la presente invención. En el contexto de la presente invención se entiende por otras secuencias nucleotídicas aquellas secuencias capaces de codificar para una secuencia aminoacídica funcional, en particular para aquellas secuencias funcionales que presenten un grado de identidad con la secuencia consenso arriba mencionada superior al 85%, preferiblemente superior al 90, 95, 96, 97, 98 o 99%.

En el contexto de la presente invención, por proteína DLX5 funcional se entiende el factor de transcripción implicado en el desarrollo embrionario de las extremidades así como en la diferenciación osteoblástica, mediante la activación de promotores de factores como fosfatasa alcalina y Osterix.

En el contexto de la presente invención, el término Osterix presenta las siguientes secuencias aminoacídicas y nucleotídicas consenso:

- Sec. Nucleotídica: AF477981
- Sec. Proteica: AAL84281.1



Otras secuencias nucleotídicas que codifican para la proteína Osterix funcional quedarían también abarcadas por la presente invención. Asimismo, otras secuencias aminoacídicas de la proteína Osterix funcional también quedan abarcadas por la presente invención. En el contexto de la presente invención se entiende por otras secuencias nucleotídicas aquellas secuencias  
 5 capaces de codificar para una secuencia aminoacídica funcional, en particular para aquellas secuencias funcionales que presenten un grado de identidad con la secuencia consenso arriba mencionada superior al 85%, preferiblemente superior al 90, 95, 96, 97, 98 o 99%.

En el contexto de la presente invención, por proteína Osterix funcional se entiende el factor de transcripción específico de osteoblastos, que activa la transcripción de genes como *Satb2* y  
 10 *Col1a1* durante la diferenciación osteogénica.

En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, el mediador primario es la proteína *Dlx5*, el producto de expresión es Osterix, el segundo promotor es el promotor de *Satb2* y el primer promotor es opcionalmente el promotor EF-1 $\alpha$ .

Tal y como se usa en la presente invención, la secuencia nucleotídica del promotor *Satb2* se  
 15 indica a continuación:

5'GGTTCGGAGATGGTTGTTATGATGATGGGGGCGGGGGCAGTGAGGGAGGAGG  
 AGGAGAGGGAAAGGAGGACTCCTCCAAAGGGGCACAGAGCGAGCGGGGGAGGG  
 GACGGCGGAGGAGGGGGGGGGGAGAGGGGGCTGAAAGAGCCTTTCACACCTTCG  
 GGTAGAAGACCGTTCTGGAGAGAAA 3'

20 Tal y como se usa en la presente invención, la secuencia nucleotídica del promotor EF-1 $\alpha$  se indica a continuación:

5'GTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACGTCCCCGAGAAGTTGGGGG  
 GAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGA  
 AAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATA  
 25 TAAGTGACAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACA  
 CAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCC  
 CTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCT  
 TCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCG  
 CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCT  
 30 GGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATT

TTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCC  
 AAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGGCGACGGGGCCCG  
 TGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAG  
 AATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCG  
 5 CCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAGTT  
 GCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGA  
 GGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGG  
 CCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCC  
 AGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGA  
 10 GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGC  
 CAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTG  
 GTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCC  
 TGA 3'

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un sistema de producción de un vector vírico,  
 15 preferiblemente lentivírico, para producir una partícula de vector derivada de un virus,  
 preferiblemente de un lentivirus, comprendiendo dicho sistema una secuencia de ácido nucleico  
 o un conjunto de secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes del vector  
 incluyendo las secuencias de ácido nucleico tal y como se han definido éstas en cualquiera de  
 los aspectos precedentes. Se hace notar, que las secuencias definidas en los apartados a) y b)  
 20 del primer aspecto de la presente invención se pueden encontrar en este sistema en una única  
 secuencia nucleotídica o en dos secuencias nucleotídicas (cada secuencia comprendiendo  
 cada uno de los dos cistrones). Preferiblemente dicho sistema comprende tres constructos de  
 ADN que codifican (i) los componentes del vector incluyendo las secuencias de ácido nucleico  
 tal y como se han definido éstas en cualquiera de los aspectos precedentes (vector de  
 25 transferencia) (ii) Gag y Pol y Rev y (iii) Env o (ii) Gag y Pol, (iii) Rev y (iv) Env.

Se hace notar que el término "sistema de producción de un vector vírico" se usa generalmente  
 para indicar un kit de piezas o partes que puede usarse combinado con otros componentes  
 necesarios para la producción de partículas víricas en células hospedadoras. Por ejemplo, el  
 genoma de vector lentivírico puede carecer de uno o más de los genes necesarios para  
 30 replicación vírica. Este puede combinarse en un kit con una secuencia o secuencias  
 nucleotídicas complementarias adicionales, por ejemplo en uno o más plásmidos productores.  
 Mediante la co-transfección del genoma junto con el plásmido o plásmidos productores,

deberían proporcionarse los componentes necesarios para la producción de partículas víricas infecciosas.

Como alternativa, la secuencia o secuencias nucleotídicas complementarias pueden estar presentes establemente en una línea celular de empaquetamiento que se incluye en el kit.

- 5 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar una partícula de vector viral, preferiblemente lentiviral, que comprende introducir el conjunto de secuencias de ácido nucleíco tal y como se definen éstas en una cualquiera de los aspectos precedentes, en particular en el sistema de producción de un vector vírico de la invención, en una célula hospedadora, y obtener una partícula de vector viral.
- 10 Una partícula de vector lentivírico recombinante así producida es capaz de transducir una célula receptora con un gen de interés. Una vez dentro de la célula, el genoma de ARN de la partícula de vector se transcribe inversamente a ADN y se integra en el ADN de la célula receptora.

La presente invención proporciona también una línea celular de empaquetamiento que comprende el conjunto de secuencias de ácido nucleíco tal y como se definen éstas en una  
15 cualquiera de los aspectos precedentes, en particular en el sistema de producción de un vector vírico de la invención. Por ejemplo, la línea celular de empaquetamiento puede transducirse con un sistema de vector vírico que comprende el genoma o transfectarse con un plásmido portador de un constructo de ADN capaz de codificar el genoma de ARN. La presente invención puede proporcionar también una partícula de vector lentivírico producida por dicha célula.

- 20 Como se usa en la presente memoria, el término “célula de empaquetamiento” hace referencia a una célula que contiene aquellos elementos necesarios para la producción de un virus recombinante infeccioso de los que carece el genoma de ARN. A modo de ejemplo se podría utilizar la línea celular HEK 293T, una línea que expresa el antígeno T grande de SV40 y es competente para replicar virus que lleven el origen de replicación de SV40.

- 25 El término “señal de empaquetamiento”, al que se hace referencia intercambiamente como “secuencia de empaquetamiento” o “psi”, se usa con referencia a la secuencia no codificante de acción en cis requerida para la encapsidación de hebras de ARN retrovírico durante la formación de partículas víricas. En HIV-1, esta secuencia se ha cartografiado en loci que se extienden en 5' del sitio donante de corte y empalme principal (SD) hasta al menos el codón de  
30 inicio de gag.

Pueden prepararse fácilmente líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para uso con los constructos de vector descritos anteriormente (ver ejemplos de la invención), y utilizarse para crear líneas celulares productoras para la producción de partículas de vector lentivírico.

5 Las líneas celulares de empaquetamiento pueden ser útiles para proporcionar los productos génicos necesarios para encapsidar y proporcionar una proteína de membrana para la producción de partículas de vector de alto título. La célula de empaquetamiento puede ser una célula cultivada *in vitro* tal como una línea celular de cultivo de tejido. Las líneas celulares adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de mamífero tales como líneas celulares derivadas de fibroblasto murino o líneas celulares humanas. Preferiblemente, la línea celular de empaquetamiento es una línea celular humana tal como, por ejemplo: HEK293, 293-T, TE671, 10 HT1080.

Como alternativa, la célula de empaquetamiento puede ser una célula derivada del individuo para tratar tal como un monocito, macrófago, célula sanguínea o fibroblasto. La célula puede aislarse del individuo y administrarse los componentes de empaquetamiento y de vector *ex vivo* 15 seguidos de la re-administración de las células de empaquetamiento autólogas. Como alternativa, los componentes de empaquetamiento y de vector pueden administrarse a la célula de empaquetamiento *in vivo*. Los procedimientos para introducir componentes de empaquetamiento lentivírico y de vector en células de un individuo son conocidos en la materia.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una partícula de vector viral o lentivírico 20 producida mediante el sistema vírico descrito anteriormente (ver tercer aspecto de la invención) o producida mediante el proceso del cuarto aspecto de la invención.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una célula receptora transducida con la partícula de vector viral o lentivírico del cuarto aspecto de la invención o con el polinucleótido, el casete de expresión o el vector tal y como se definen estos en cualquiera de los aspectos primero o 25 segundo de la invención, donde opcionalmente dicha célula es una célula madre mesenquimal (MSC). Dicha célula madre mesenquimal puede ser destinada para tratamientos de tipo autólogo o alogénicos.

En el contexto de la presente invención, por célula madre mesenquimal se entiende una célula adulta multipotente, con morfología fibroblastoide, originada a partir de la capa germinal 30 mesodérmica, con capacidad de diferenciarse *in vitro* o *in vivo* a diversos tipos de células,

incluyendo entre otros osteocitos, condrocitos, y adipocitos. Este tipo de células presentan un perfil característico de moléculas de membrana, en humanos: CD73+, CD90+, CD105+, CD166+, CD45-, CD34-, CD19-, CD14-, HLA DR.

5 En el contexto de la presente invención por células transducidas se refiere también a una célula que se ha transducido con un sistema de vector tal y como se ha definido éste en cualquiera de los aspectos precedentes.

La transducción con el sistema de vector de la presente invención puede conferir o aumentar la capacidad de la célula, por ejemplo puede conferir a la célula una capacidad osteogénica o una mayor capacidad osteogénica. La célula puede transducirse *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, si la célula es una célula de un sujeto mamífero, la célula puede retirarse del sujeto y transducirse fácilmente para reimplantación en el sujeto (transducción *ex vivo*). Como alternativa, la célula puede transducirse mediante transferencia génica *in vivo*, usando el sistema de vector de la presente invención de acuerdo con técnicas estándares. Si la célula es parte de una línea celular que es estable en cultivo (concretamente, que puede sobrevivir a numerosos pasos y puede multiplicarse *in vitro*), puede transducirse entonces *in vitro* mediante técnicas estándares, por ejemplo, mediante la exposición de la célula a sobrenadantes víricos que comprenden vectores que expresan los genes de interés.

Tal y como se ha expresado con anterioridad, preferiblemente la célula transducida es una célula madre mesenquimal, preferiblemente una MSC humana de cualquier origen.

20 Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a la célula del sexto aspecto de la invención, o a un vector, una partícula de vector viral o lentivírico, un polinucleótido o un casete de expresión tal y como se han definido estos en cualquiera de los aspectos precedentes, para su uso en terapia.

25 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula del sexto aspecto de la invención, o un vector, una partícula de vector viral o lentivírico, un polinucleótido o un casete de expresión tal y como se han definido estos en cualquiera de los aspectos precedentes.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas en el aspecto precedente pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderán típicamente uno cualquiera o más de un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los

portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la materia farmacéutica y se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede realizarse con respecto a la vía de administración pretendida y a la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, portador, excipiente y diluyente cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento o agente solubilizante adecuado.

Pueden proporcionarse en la composición farmacéutica conservantes, estabilizadores, tintes e incluso agentes aromatizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido phidroxibenzoico. Pueden usarse también antioxidantes y agentes de suspensión.

Puede haber diferentes requisitos de composición/formulación dependientes de los diferentes sistemas de suministro. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse usando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo, como un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o solución ingerible, o por vía parenteral en la que la composición se formula en forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para suministrarse por ambas vías.

Cuando la composición farmacéutica va a suministrarse por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería poder permanecer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal; por ejemplo, debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de un supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvo para espolvorear, mediante el uso de un parche dérmico, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa o tiza, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorante, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones pueden usarse mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para hacer la

disolución isotónica con la sangre. Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o trociscos que pueden formularse de manera convencional.

5 Un facultativo determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual, y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular y la gravedad de la afección.

Las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse por vía oral. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse mediante inyección directa. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse por vía tópica. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse por inhalación. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente invención pueden administrarse también mediante uno o más de los medios de administración parenteral, mucoso, intramuscular, intravenoso, subcutáneo, intraocular o transdérmico, y se formulan para dicha administración.

A modo de ejemplo adicional, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse de acuerdo con un régimen de 1 a 10 veces al día, tal como una o dos veces al día. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente particular pueden variarse y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y el periodo de acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y momento de la administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, gravedad de la afección particular y el hospedador que esté experimentando la terapia.

Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse mediante una o más de las siguientes vías: administración oral, inyección (tal como inyección directa) , tópica, por inhalación, administración parenteral, administración mucosa, administración intramuscular, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraocular o administración transdérmica.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz del vector pueden usarse en el tratamiento de trastornos. Por facilidad de referencia, se proporciona ahora parte

de esta lista de trastornos: actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de linfocitos T y, por tanto, actividad antiinflamatoria; actividad antiinmunitaria, concretamente, efectos inhibidores frente a una respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada a inflamación; enfermedades asociadas a virus y/u otros patógenos intracelulares;

5 inhibición de la capacidad de macrófagos y linfocitos T de adherirse a los componentes de matriz extracelular y fibronectina, así como expresión del receptor fas regulada positivamente en linfocitos T; inhibición de una reacción inmunitaria e inflamación indeseadas, incluyendo artritis, incluyendo artritis reumatoide, inflamación asociada a hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus sistémico eritematoso, enfermedades de colágeno y otras enfermedades

10 autoinmunitarias, inflamación asociada a aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de dificultad respiratoria 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,

15 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 epididimoorquitis, infertilidad, traumatismo testicular u otras enfermedades testiculares relacionadas con el sistema inmunitario, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto

20 recurrente, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas relacionadas con el sistema inmunitario y/o la inflamación, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo, retinitis o edema macular quistoide, oftalmía simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunitarios e inflamatorios de la enfermedad degenerativa del fondo de ojo,

25 componentes inflamatorios del traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vitreorretinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, por ejemplo después de operación de filtración de glaucoma, reacción inmunitaria y/o inflamatoria contra implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas relacionadas con el sistema inmunitario y la inflamación, inflamación asociada a enfermedades o afecciones o trastornos

30 autoinmunitarios en que, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, sería beneficiosa una supresión inmunitaria y/o inflamatoria, complejo de demencia relacionada con SIDA, encefalopatía relacionada con VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, afecciones o trastornos



degenerativos del SNC, componentes inflamatorios de apoplejías, síndrome pospoliomelítico, componentes inmunitarios e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomyelitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, 5 seudotumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares y enfermedades, afecciones o trastornos relacionados con el sistema inmunitario y la inflamación de los sistemas nerviosos central y periféricos, inflamación postraumática, choque séptico, 10 enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios de trasplantes, complicaciones y efectos secundarios inflamatorios y/o inmunitarios de terapia génica, por ejemplo, debido a infección con un portador vírico, o inflamación asociada al SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta inmunitaria humoral y/o celular, para tratar o mejorar 15 enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo leucemia, al reducir la cantidad de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o tratamiento de rechazo de injerto en casos de trasplante de células, tejidos y órganos naturales o artificiales tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido cutáneo natural o artificial. Los trastornos relacionados con el cáncer específicos incluyen, pero sin limitación: tumores sólidos; tumores 20 de transmisión hemática tales como leucemias; metástasis tumorales; tumores benignos, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomas y granulomas piogénicos; artritis reumatoide; psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolenticular, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; 25 angiogénesis de miocardio; neovascularización de placa; telangiectasia; artropatía hemofílica; angiofibroma; granulación de heridas; circulación colateral coronaria; circulación colateral cerebral; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis de miembro isquémico; glaucoma neovascular; fibroplasia retrolenticular; neovascularización diabética; enfermedades relacionadas con Helicobacter, fracturas, vasculogénesis, hematopoyesis, ovulación, 30 menstruación y placentación.

Preferiblemente la composición farmacéutica de la invención se aplica en osteogénesis o en regeneración ósea.

Los siguientes ejemplos presentan como única finalidad ilustrar la presente invención.

## **Ejemplos**

### **MATERIALES Y MÉTODOS de los ejemplos**

#### **1. Generación de vectores lentivirales.**

- 5 La construcción de los vectores correspondientes a Dlx5 (gen de interés) y GFP (control negativo) se ha llevado a cabo en varias fases:
- a. En primer lugar, se eliminó el casete IRES+GFP del plásmido pWPI (adquirido a Addgene, según catálogo e instrucciones contenidas en [www.addgene.org/](http://www.addgene.org/)), y se insertó en su lugar una secuencia con nuevos sitios de restricción (BamHI y MluI), generando así el vector pWPI-PL, con objeto de poder clonar posteriormente los cDNAs de Dlx5 y GFP, seguidos del promotor de Satb2 y el cDNA de Cre.
  - b. En segundo lugar, se introdujo en el sitio PmeI de la construcción así generada el cDNA de Dlx5, obtenido mediante amplificación por PCR. De esta forma se obtuvo el plásmido pWPI-PL-DLX5.
  - c. A continuación, se introdujo en el sitio PmeI de la construcción mencionada en el apartado a) el cDNA de la proteína fluorescente GFP, obteniendo de esta forma el control negativo pWPI-PL-GFP.
  - d. Por último, en los plásmidos pWPI-PL-DLX5 y pWPI-PL-GFP se introdujo en el sitio MluI de ambos plásmidos un fragmento del promotor de Satb2, amplificado mediante PCR a partir de DNA genómico de ratón al que se añadieron extremos 5'MluI y 3'XhoI, seguido del cDNA de Cre, obtenido por PCR partiendo de un plásmido previamente generado en el laboratorio (pHRSIN-Cre), al que se añadieron sitios 5'XhoI y 3'MluI. De esa manera se obtuvieron, respectivamente, los plásmidos pWPI-PL-DLX5-SCre y pWPI-PL-GFP-SCre.
- 25 Las enzimas de restricción (PmeI, MluI, BamHI, XhoI) se adquirieron a New England Biolabs, y los oligonucleótidos empleados en las PCRs y para la generación del plásmido pWPI-PL son:

Generación plásmido pWPI-PL:

5´AAACTAGGATCCTAACGCGTCATT 3´  
 5´CGAATGACGCGTTAGGATCCTAGTTT 3´

PCR Sabt2:

5 5´GGTCAGGGTGTCTTCTTC 3´  
 5´GCTCGAGGTTCCGAGATGGTTGTTATG 3´  
 5´CGCCGCAGCCTCCCAGTC 3´  
 5´GACGCGTTTCTCTCCAGAACCGGTCTTC 3´

10 PCR Cre:

5´GCTCGAGATGTCCAATTTACTGACCG 3´  
 5´CACGCGTCTAATCGCCATCTTCCAG 3´

Para los distintos ejemplos detallados en la presente invención, se utilizaron los siguientes  
 15 constructos o vectores lentivirales: pWPI-PL-GFP, pWPI-PL-GFP-SCre, pWPI-PL-DLX5 y pWPI-  
 PL-DLX5-SCre (fig. 2). Las partículas virales se produjeron mediante técnicas estándar de  
 transfección con fosfato cálcico de células HEK-293T (utilizadas como células de  
 empaquetamiento), de cada uno de estos vectores junto con los plásmidos auxiliares psPAX y  
 VSVg (Addgene). Después de 48h, los sobrenadantes de estas células, que contienen las  
 20 partículas virales, se recogieron y se ultracentrifugaron a 4°C (2h a 26.000 rpm).

## **2. Estudio de la capacidad de diferenciación ósea in vitro de las MSCs transducidas con los vectores generados.**

### *a. Cultivos celulares y transducción lentiviral:*

Se utilizaron MSCs primarias humanas obtenidas a partir de médula ósea (también en el caso  
 25 de los ensayos in vivo), que se cultivaron en condiciones estándar, con medio DMEM más 10%  
 FBS. Para infectar dichas células, se sembraron en condiciones de subconfluencia y se  
 añadieron los virus (MOI 5) en presencia de polibreno (Sigma) 8 µg/ml durante 16h.

### *b. Estudio de la capacidad osteogénica de las MSCs transducidas in vitro:*

Las células transducidas con el virus control GFP o los virus codificantes para Dlx5 se cultivaron  
 30 durante dos semanas en medio de diferenciación ósea: medio IMDM suplementado con

dexametasona 0.1  $\mu$ M,  $\beta$ -glicerofosfato 10mM, y ácido ascórbico 0.2mM. Para analizar el grado de diferenciación in vitro se tiñó el cultivo con Alizarin red y se visualizó en un microscopio de contraste de fases.

*c. Análisis del citoesqueleto de actina:*

- 5 Las células transducidas con los diferentes vectores lentivirales se fijaron en paraformaldehído 4% y se tiñieron posteriormente con Texas Red-X phalloidin (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y DAPI (Invitrogen) dilución 1:500 durante 5min. Las células así marcadas fueron visualizadas en un microscopio confocal SP5.

10 **3. Análisis del potencial osteogénico in vivo de los implantes cerámicos en presencia de las MSCs modificadas.**

*a. Formación de implantes cerámicos:*

La formación de los implantes cerámicos se llevo a cabo según el protocolo descrito por el grupo investigador. Brevemente, las MSCs transducidas con los distintos vectores (aprox.  $10^6$  células) se colocaron en tubos de 50ml con 0,1g de gránulos de cerámica bifásica (MBCP, Biomatlante) y fueron cultivadas en esas condiciones durante 16h. Entonces se añadieron 100  $\mu$ l de DMEM completo junto con trombina (SIGMA) disuelta en 0.22mM CaCl<sub>2</sub>, y fibrinógeno, incubándose durante dos horas en condiciones estándar de cultivo celular. La mezcla se inoculó subcutáneamente en ratones inmunodeficientes NOD/SCID anestesiados con ketamina/xilacina. Tras 15 días, los implantes fueron extraídos para su estudio mediante técnicas de imagen (microCT) y análisis histológico. Se incluyeron además implantes que combinan BMP-2 con células transducidas con el vector control GFP, para poder evaluar adecuadamente la capacidad osteogénica de las MSCs modificadas frente al factor. La densidad mineral de las muestras se cuantificaron mediante el programa GEHC microview (<http://microview.sourceforge.net/>).

- 25 b. Para su *análisis histológico*, los implantes cerámicos se fijaron en formalina y posteriormente se decalcificaron mediante su tratamiento con Osteosoft (Merck Millipore) durante 48h, siendo procesados posteriormente para su inclusión en parafina. En todos los casos se realizó una tinción estándar con hematoxilina-eosina. En algunos casos, además, se llevó a cabo inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-vimentina humana (Abcam).

**4. Análisis estadístico.** El análisis estadístico de los datos ha sido llevado a cabo mediante ANOVA, seguido del test de Dunnet para comparaciones múltiples. Se considera que existe significación estadística cuando  $p < 0.05$ .

**Ejemplo 1. Generación de vectores lentivirales.**

5 Se construyeron vectores lentivirales que codifican para Dlx5 y para GFP (virus control). Se empleó como base un vector lentiviral auto-inactivador, que tiene delecionada la secuencia enhancer/promotora del U3 viral situado en el LTR 3'. Para dirigir la expresión del transgén, se utilizó el promotor eucariota de EF-1 $\alpha$ , que permite obtener unos niveles de expresión similares a los endógenos, así como evitar la metilación *in vivo* del promotor, frecuente en los promotores virales. Para obtener un sistema de expresión controlada, se generó un vector dual que, además de Dlx5 (o GFP) expresado bajo el control del promotor de EF-1 $\alpha$ , codifica para la recombinasa Cre dirigida por el fragmento mínimo del promotor de Sabt2 que contiene los elementos de respuesta a Osterix. Por otro lado, el vector de partida contiene una secuencia LoxP (diana de Cre) en la región U3 3'. Con la integración del genoma viral, y debido al mecanismo de transcripción reversa, esta región U3 3' modificada se copia a ambos lados del DNA del provirus, que de esta manera queda flanqueado por secuencias LoxP. Así, en ausencia de Osterix, Dlx5 es sintetizada y pone en marcha el mecanismo de diferenciación osteogénica. Conforme avanza el proceso, el aumento de niveles de Osterix activaría la expresión de Cre, dando como resultado la deleción del DNA del provirus (que incluye tanto Dlx5 como Cre, evitando también de esta manera la posible toxicidad derivada de la sobreexpresión mantenida de la recombinasa) (fig.1).

Durante el proceso de construcción de los vectores lentivirales, se generaron dos construcciones adicionales que carecen de la recombinasa Cre, y que por tanto expresan Dlx5 y GFP de forma constitutiva, no regulable por la diferenciación ósea (pWPI-PL-GFP y pWPI-PL-DLX5). Durante el estudio, estas construcciones fueron empleadas como controles de expresión y funcionales de sus contrapartidas de expresión autolimitada (fig.2).

**Ejemplo 2. Estudio de la capacidad osteogénica de las MSCs transducidas in vitro**

En paralelo a los análisis de la expresión del transgén, se comenzaron a realizar ensayos de diferenciación in vitro en células infectadas con los diversos virus. Tras 4-5 días de infección, se observaron cambios morfológicos evidentes (fig.3). En el caso de las MSCs infectadas con

pWPI-PL-DLX5\_sCre, en condiciones basales se evidenció la aparición de células de aspecto redondeado, con morfología similar a la que adoptan las células control (infectadas con pWPI-PL-GFP) en presencia de medio de diferenciación. Por el contrario, las MSCs infectadas con pWPI-PL-DLX5 adoptaban una morfología mucho más alargada y de aspecto fibroblastoide.

5 Esto sugería que algunas células infectadas con pWPI-PL-DLX5\_sCre habían iniciado *per se* un proceso de diferenciación osteogénica controlado, similar al llevado a cabo por las MSCs control en presencia de medio osteogénico, lo cual no ocurría con las infectadas con pWPI-PL-DLX5.

Se ha descrito que la diferenciación osteogénica está acompañada de cambios característicos en el citoesqueleto de actina de las MSCs. Durante este proceso, se hacen patentes haces de actina perinucleares que “enmarcan” el cuerpo celular, de conformación poligonal, mostrando abundantes fibras de stress y un aumento de la polimerización de actina. Por este motivo, se llevó a cabo un análisis del citoesqueleto de actina de MSCs transducidas con los diversos virus, mediante su tinción con faloidina marcada con Texas Red (fig.4). Las células transducidas con

10 pWPI-PL-DLX5\_sCre, mostraban cambios en su citoesqueleto idénticos a los descritos para el proceso de diferenciación osteogénica en condiciones basales. Las MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5 presentaban asimismo un aumento en el grado de polimerización de la actina, que en este caso se colocaba en grandes haces paralelos al eje longitudinal de las células, de aspecto fibroblastoide.

Por último, para evaluar el potencial osteogénico *in vitro* de las MSCs transducidas con los distintos vectores lentivirales, se cultivaron en medio de diferenciación osteogénica o medio control durante 14 días y se realizó una tinción con Alizarin Red, que pone de manifiesto la presencia de precipitados de calcio en el cultivo (fig.5). Se pudo comprobar que las células infectadas con pWPI-PL-DLX5\_sCre presentaban pequeños focos aislados de diferenciación

20 osteogénica, mientras que en las infectadas con pWPI-PL-DLX5 mostraban un grado de diferenciación basal considerablemente mayor.

### **Ejemplo 3. Estudio de la capacidad osteogénica de las MSCs transducidas *in vivo***

A continuación se procedió a estudiar el potencial osteogénico *in vivo* de las células transducidas con los diversos vectores lentivirales. Dada su elevada dependencia del microambiente, el potencial de diferenciación de las MSCs puede variar cuando se analiza *in vivo*, de manera que los ensayos con implantes cerámicos subcutáneos en ratón eran

30

fundamentales para evaluar de forma adecuada la validez del sistema. MSCs humanas transducidas con pWPI-PL-GFP, pWPI-PL-DLX5\_sCre o pWPI-PL-DLX5 fueron incluidas 1-2 días tras la infección en implantes cerámicos que se colocaron subcutáneamente en el flanco de ratones inmunodeficientes NOD/SCID. En el caso del pWPI-PL-GFP se incluyó el factor BMP-2 como control positivo de diferenciación.

En un primer experimento, previamente a su procesamiento histológico, se analizó la densidad ósea (BMD) de los implantes mediante microCT, y se pudo observar que existía un incremento significativo en la misma frente al control en aquéllos que llevaban MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5\_sCre, de una magnitud similar a la obtenida en los implantes que llevaban BMP-2 (fig.6A). También se obtuvo un aumento de BMD en los implantes de MSCs transducidas con pWPI-PL-DLX5, si bien en este caso no era significativo estadísticamente. Para evitar que variaciones en la cantidad de cerámica de partida pudieran alterar la medida, se normalizaron los valores de BMD frente al porcentaje de hueso presente en cada implante, obteniéndose un resultado similar, si bien ahora el incremento obtenido con pWPI-PL-DLX5 alcanzó significación estadística (fig.6B).

Seguidamente se llevó a cabo el análisis histológico de estos implantes, al igual que de los procedentes de un segundo experimento (fig.7). En ambos casos, la tinción con hematoxilina-eosina puso de manifiesto en los implantes GFP+BMP-2, Dlx5\_sCre y Dlx5 la presencia de áreas similares de escasa celularidad con tinción homogénea para eosina, sugerentes de osteoide. Es de resaltar que, según la tinción con anti-vimentina, en el caso de Dlx5\_sCre y Dlx5 la presencia de zonas de osteoide se circunscribía a aquéllas donde se encontraban células de origen humano, es decir, la formación de hueso se limitaba a las áreas donde se encontraban las MSCs transducidas.

## REIVINDICACIONES

1. Una secuencia polinucleotídica que comprende:

- 5           a. un polinucleótido de interés que codifica para un mediador primario intracelular y un primer promotor eucariota, en el que el primer promotor eucariota controla la expresión de dicho polinucleótido de interés, y
- 10           b. un polinucleótido que codifica para la proteína CRE recombinasa y un segundo promotor eucariota, en el que el segundo promotor controla la expresión de la proteína Cre recombinasa y en el que el segundo promotor eucariota queda activado por un producto de expresión del polinucleótido de interés del paso a) con lo que se produce un control endógeno de la expresión de dicho polinucleótido,

15           donde por mediador primario intracelular se entiende el codificado de forma directa por el polinucleótido de interés, donde por producto de expresión se entiende un mediador secundario intracelular, donde por mediador secundario intracelular se entiende un mediador sintetizado por una célula diana como consecuencia del proceso puesto en marcha por la expresión del mediador primario y donde por segundo promotor se entiende un promotor específico de

20           respuesta al mediador secundario intracelular.

2. La secuencia polinucleotídica de la reivindicación 1, donde dicha secuencia es un casete de expresión.

3. Un vector que comprende la secuencia polinucleotídica de la reivindicación 1.

25

4. Un vector viral que comprende la secuencia polinucleotídica de la reivindicación 1 o el casete de expresión de la reivindicación 2.

30           5. El vector viral de la reivindicación 4, donde dicho vector es un vector lentiviral bicistrónico recombinante de expresión autolimitada capaz de transducir una célula diana, donde por vector de expresión autolimitada se entiende aquél que contiene elementos que permiten eliminar el provirus del genoma de la célula diana de forma regulada



endógicamente mediante la acción de un mediador secundario sintetizado por la célula diana en respuesta a la expresión del polinucleótido de interés.

5 6. Un vector lentivírico bicistrónico de expresión autolimitada recombinante que comprende:

10 a. El conjunto de secuencias nucleotídicas que codifican las proteínas y demás factores requeridos implicados en la regulación postranscripcional, así como en el empaquetamiento del virus, donde dichas secuencias se seleccionan de la lista que consiste en: RRE (Rev Response Element); cPPT (central Polypurine Track) y WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element),

15 b. Un cistrón que comprende un polinucleótido de interés que codifica para un mediador primario intracelular y un primer promotor eucariota, en el que el primer promotor eucariota controla la expresión de dicho polinucleótido de interés, y

20 c. un segundo cistrón que comprende un polinucleótido que codifica para la proteína Cre recombinasa y un segundo promotor eucariota, en el que el segundo promotor controla la expresión de la proteína Cre recombinasa y en el que el segundo promotor eucariota queda activado por un producto de expresión del polinucleótido de interés del paso a) con lo que se produce un control endógeno de la expresión de dicho polinucleótido, y

25 d. donde dicho vector comprende la presencia de dos regiones loxP flanqueando el provirus tras la integración del DNA en la célula diana,

30 donde por mediador primario intracelular se entiende el codificado de forma directa por el polinucleótido de interés, donde por producto de expresión se entiende un mediador secundario intracelular, preferiblemente implicado en la diferenciación celular, donde por mediador secundario intracelular implicado en la diferenciación celular se entiende un mediador sintetizado por una célula diana como consecuencia del proceso puesto en marcha por la expresión del mediador primario y donde por segundo promotor se entiende un promotor específico de respuesta al mediador secundario intracelular.

- 5
7. El polinucleótido de la reivindicación 1, el casete de expresión de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en el que el gen de interés codifica para un mediador primario intracelular implicado en la diferenciación y el producto de expresión es un mediador secundario intracelular implicado en la diferenciación.
- 10
8. El polinucleótido de la reivindicación 1, el casete de expresión de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el gen de interés codifica para un mediador primario intracelular implicado en la diferenciación osteogénica y el producto de expresión es un mediador secundario intracelular implicado en la diferenciación osteogénica.
- 15
9. El polinucleótido de la reivindicación 1, el casete de expresión de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el gen de interés es el Dlx5 (Sec. Nucleotídica: NM\_005221; Sec. Proteica: NP\_005212.1) y donde el producto de expresión es Osterix (Sec. Nucleotídica: AF477981; Sec. Proteica: AAL84281.1)
- 20
10. El polinucleótido de la reivindicación 1, el casete de expresión de la reivindicación 2 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el gen de interés heterólogo es el Dlx5, el producto de expresión es Osterix (Sec. Nucleotídica: AF477981; Sec. Proteica: AAL84281.1) y donde el segundo promotor es el promotor de Satb2 y el primer promotor es el promotor EF-1□.
- 25
11. El polinucleótido, el casete de expresión o el vector según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un elemento regulador post-transcripcional o un elemento traduccional.
- 30
12. Un sistema de producción de vector vírico para producir una partícula de vector derivada de un virus comprendiendo dicho sistema una secuencia de ácido nucleico o un conjunto de secuencias de ácido nucleico que codifican los componentes del vector incluyendo las secuencias de ácido nucleico tal y como se han definido éstas en una cualquiera de las reivindicaciones 1- 2 y 7-11.

13. El sistema de producción según la reivindicación 12, donde dicho sistema de producción es el sistema de producción de un vector lentivírico y en el que la secuencia de ácido nucleico o el conjunto de secuencias de ácido nucleico comprende tres constructos de ADN que codifican (i) los componentes del vector incluyendo las secuencias de ácido nucleico tal y como se han definido éstas en cualquiera de la reivindicaciones precedentes, (ii) Gag y Pol y Rev y (iii) Env o (ii) Gag y Pol, (iii) Rev y (iv) Env.
14. Un proceso para preparar una partícula de vector viral que comprende introducir la secuencia de ácido nucleico o el conjunto de secuencias de ácido nucleico tal y como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1- 2 y 7-11, en una célula hospedadora, y obtener una partícula de vector viral.
15. Una partícula de vector viral o lentivírico producida mediante el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13 o producida mediante el proceso según la reivindicación 14.
16. Una célula transducida o transformada con el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3-6 o con la partícula de vector viral o lentivírico de la reivindicación 15.
17. La célula transducida o transformada de la reivindicación 16 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3-6 o la partícula de vector viral o lentivírico de la reivindicación 15, para uso en terapia.
18. Una composición farmacéutica que comprende la célula transducida o transformada de la reivindicación 16 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3-6 o la partícula de vector viral o lentivírico de la reivindicación 15.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18 o la célula transducida o transformada de la reivindicación 16 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3-6

o la partícula de vector viral o lentivírico de la reivindicación 15, para suministrar un gen de interés a un sitio diana necesitado del mismo.

- 5 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 18 o la célula transducida o transformada de la reivindicación 16 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 3-6 o la partícula de vector viral o lentivírico de la reivindicación 15, para su uso en osteogénesis o en la regeneración ósea.

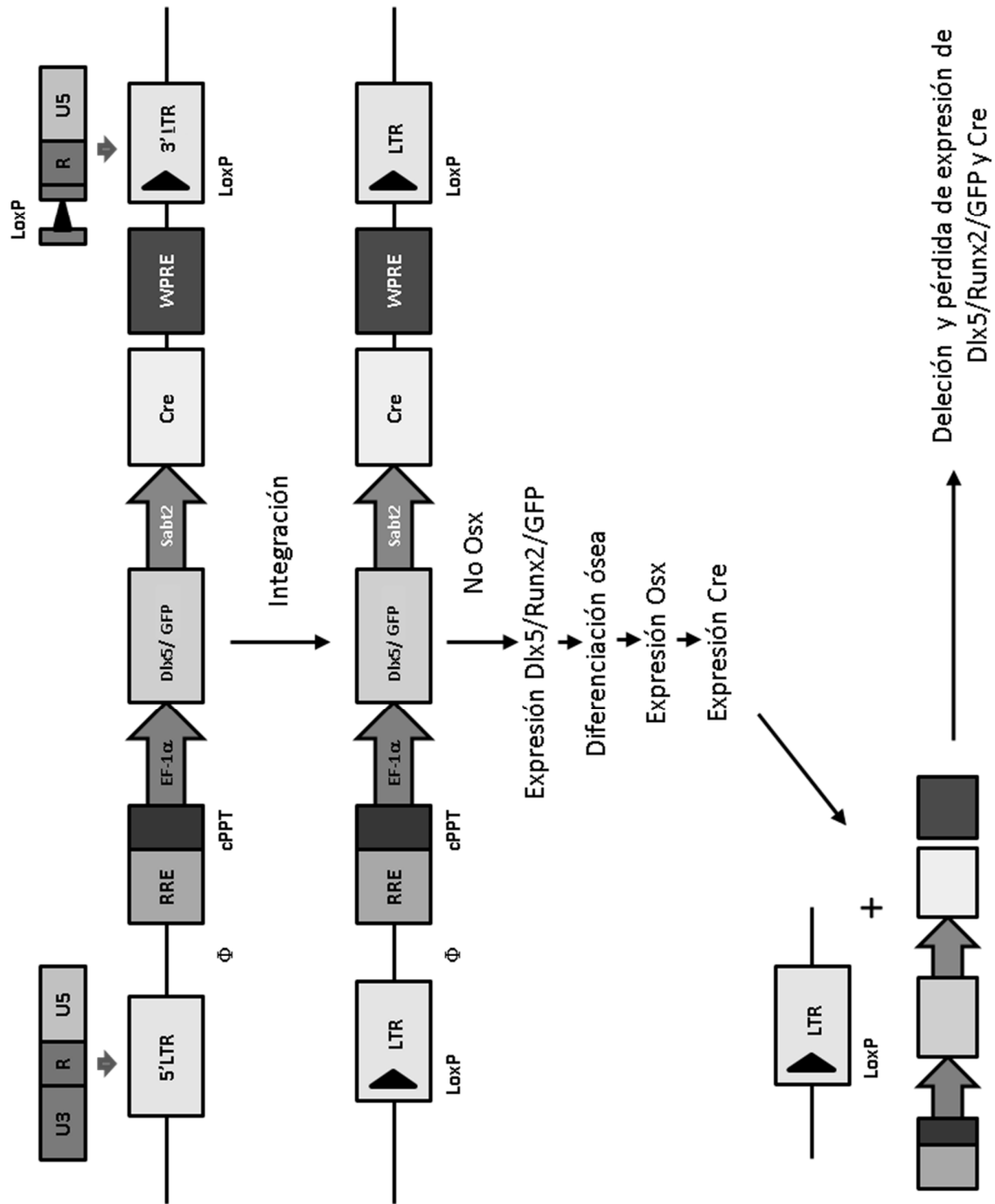


Fig. 1

**Diferenciación  
Osteogénica:**

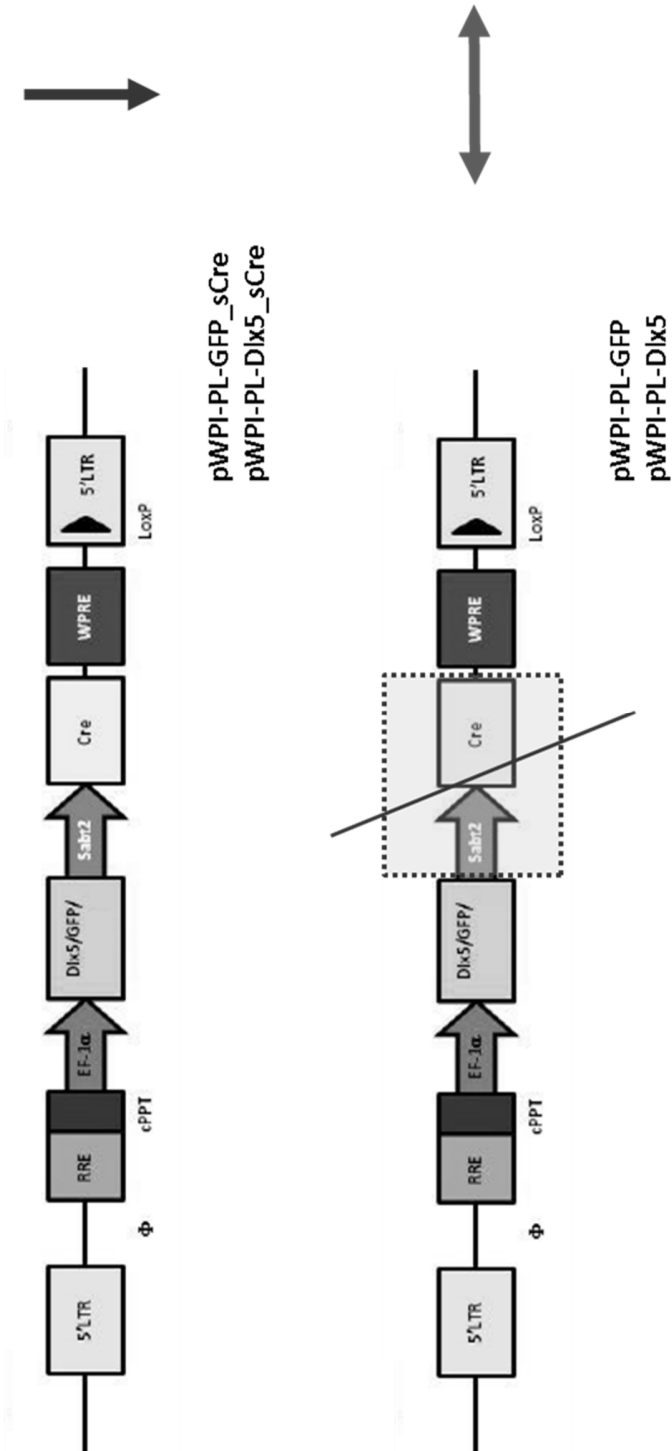


Fig. 2

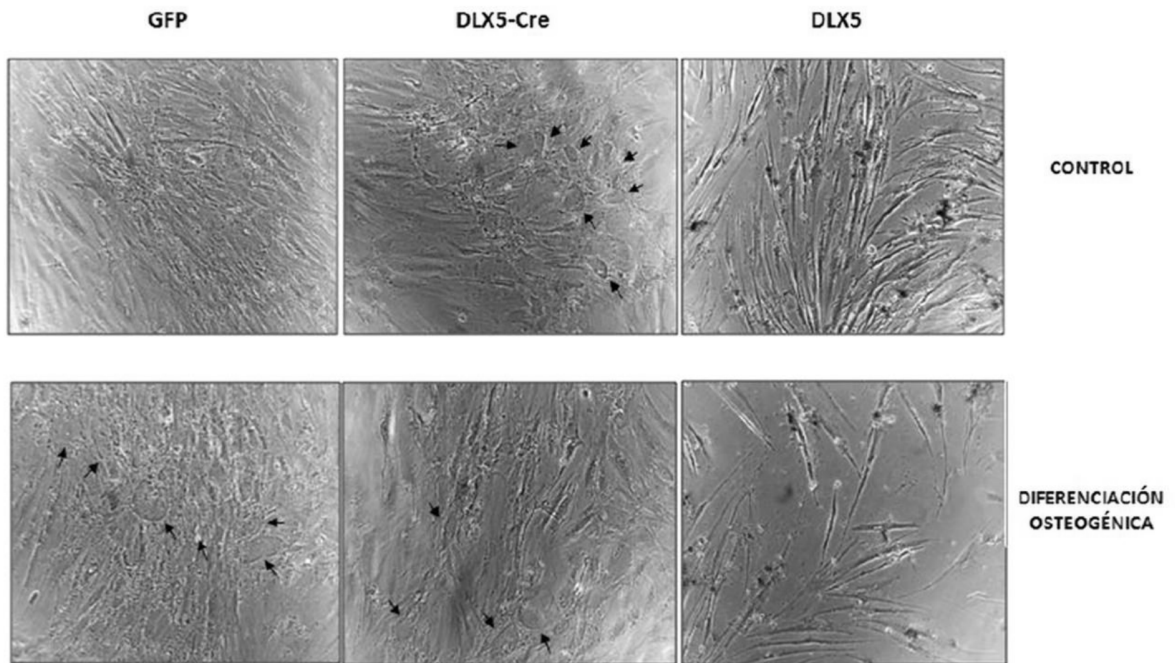


Fig. 3

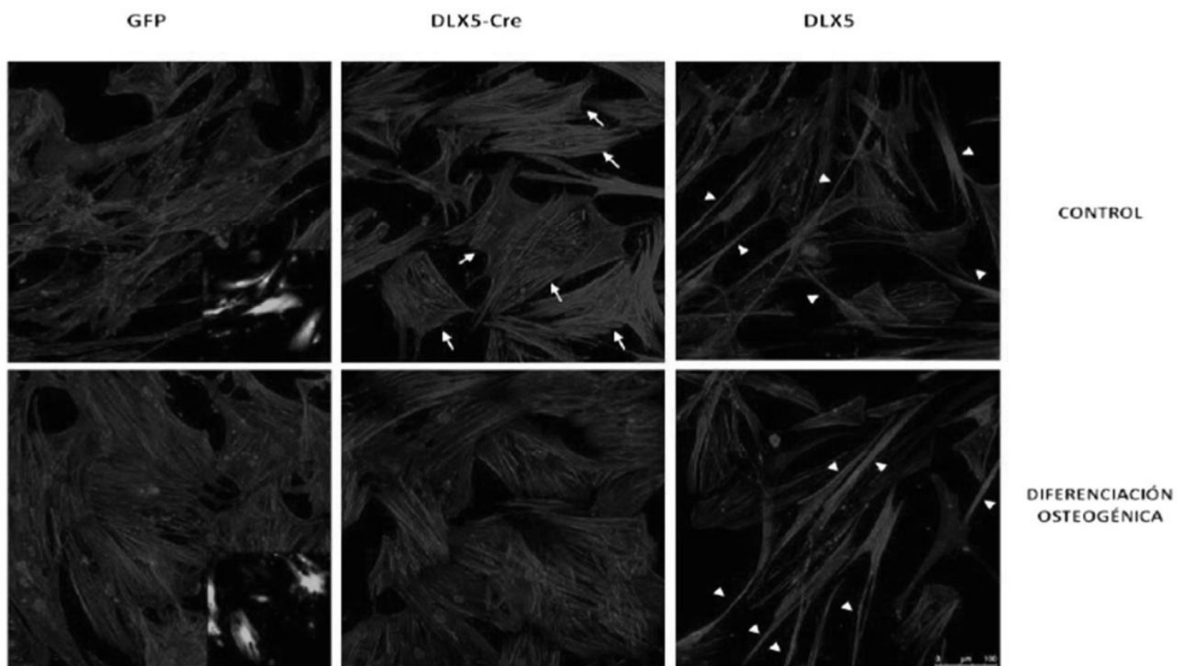


Fig. 4

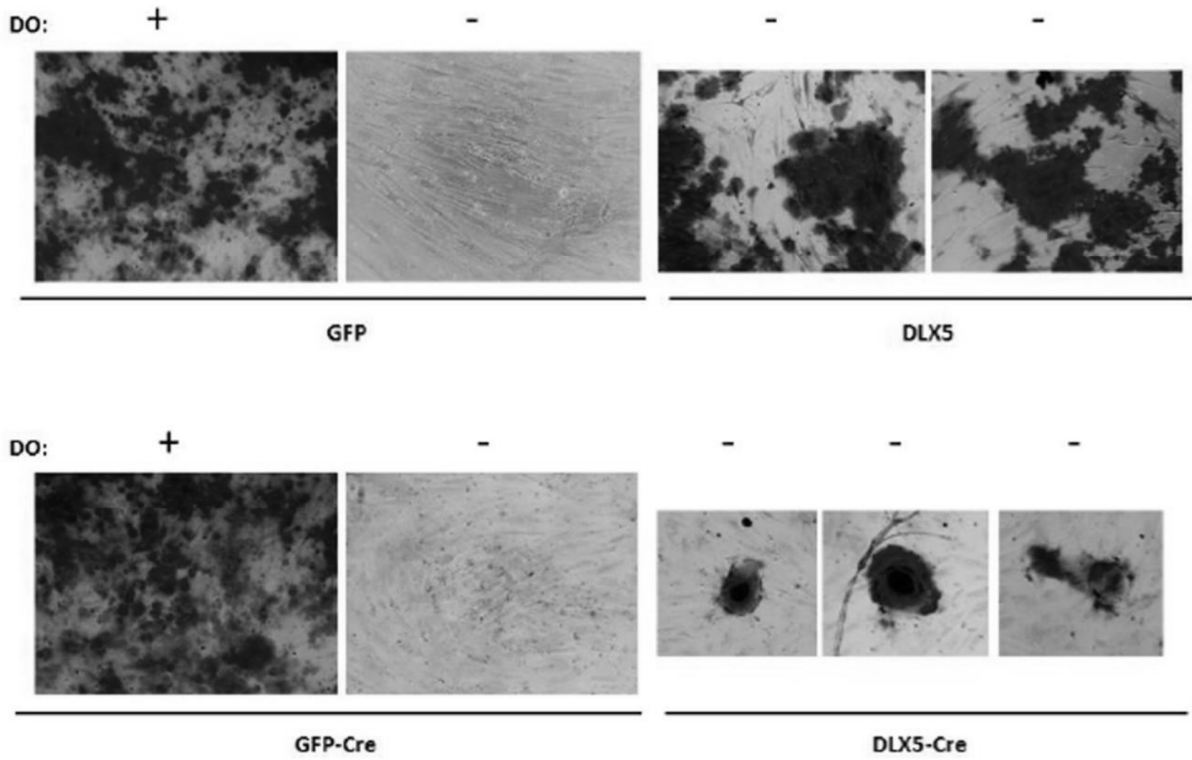


Fig. 5

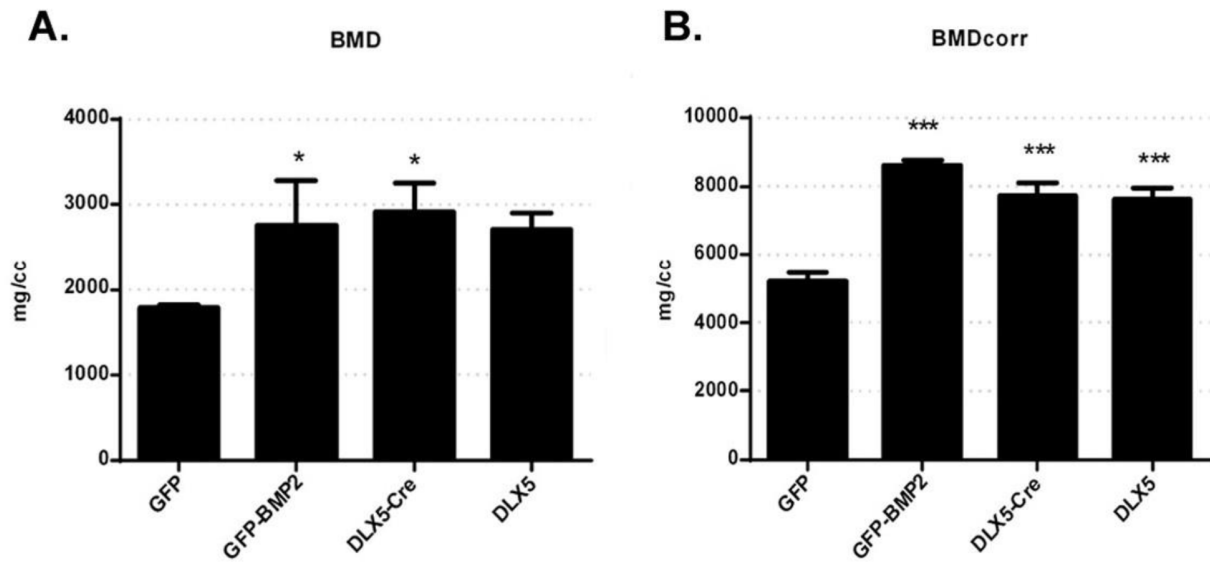


Fig. 6



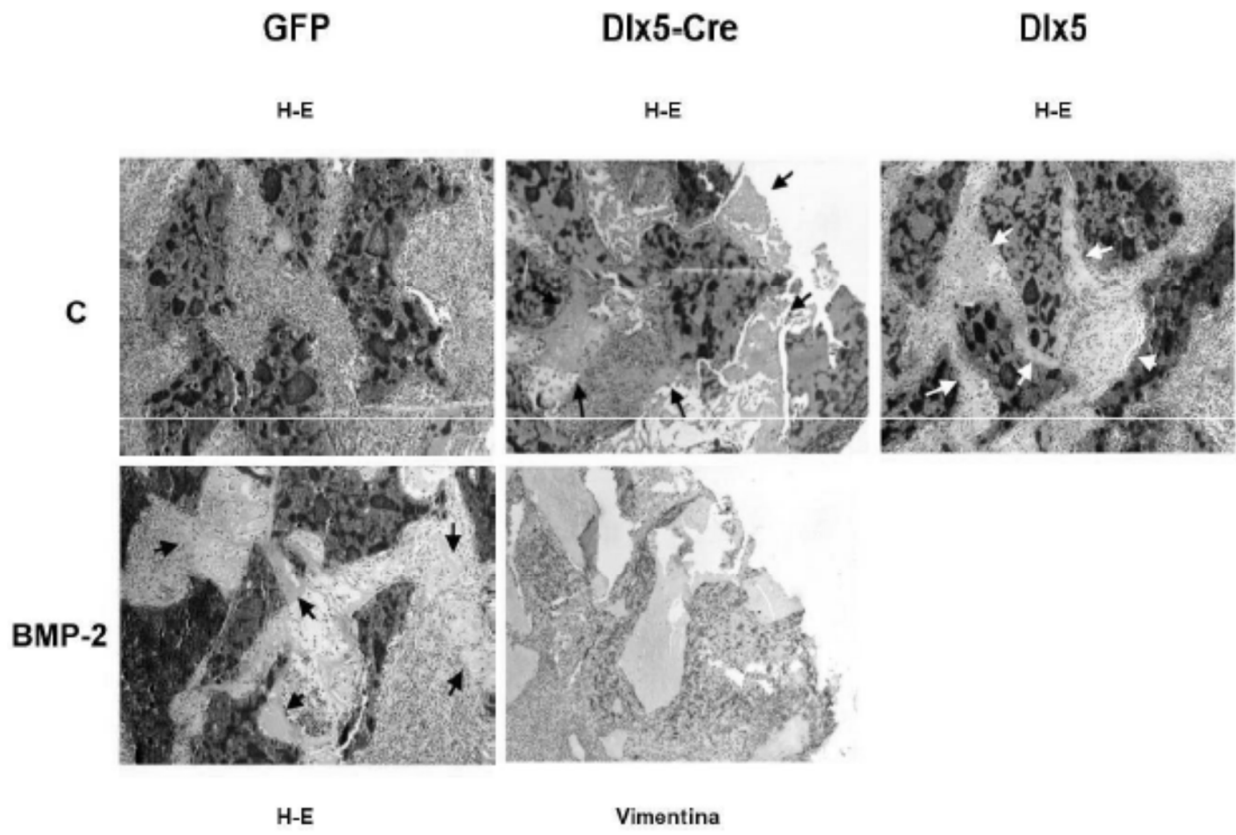


Fig. 7

Lista de Secuencias

<110> Instituto de Salud Carlos III  
 <120> VECTOR LENTIVIRAL DE EXPRESIÓN AUTOLIMITADA  
 <130> 900606  
 <160> 14  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 234  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> RRE: Rev response element  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(234)  
 <400> 1  
 aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat 60  
 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 120  
 gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 180  
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcct 234  
 <210> 2  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> PPT: (central Polypurine Track)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(16)  
 <400> 2  
 aaaagaaaag ggggga 16  
 <210> 3  
 <211> 593  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> WPRE: (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(593)  
 <400> 3  
 tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc 60

ES 2 578 903 A1

ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttccccgtat 120  
 ggctttcatt ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg 180  
 gcccgttgtc aggcaacgtg gcggtggtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg 240  
 ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc ccctccctat 300  
 tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgtgc tggacagggg ctcggctggt 360  
 gggcactgac aattccgtgg tgttgctggg gaagctgacg tcctttccat ggctgctcgc 420  
 ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa 480  
 tccagcggac cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg 540  
 ccttcgccct cagacgagtc ggatctcct ttgggccgcc tccccgcac ggg 593

<210> 4  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Psi (Secuencia necesaria para empaquetar el RNA viral en la cápside del virus)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(45)

<400> 4  
 tgagtacgcc aaaaattttg actagcggag gctagaagga gagag 45

<210> 5  
 <211> 187  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> secuencia nucleotídica del promotor Satb2

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(187)

<400> 5  
 ggttcggaga tggttgttat gatgatggg gcggggggca gtgagggagg aggaggagag 60  
 ggaaaggagg actcctcaa agggcacca gagcgagcgg gggaggggac ggcggaggag 120  
 ggggggggga gagggggctg aaagacctt tcacaccttc gggtagaaga ccggttctgg 180  
 agagaaa 187

<210> 6  
 <211> 1170  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> secuencia nucleotídica del promotor EF-1 alpha

ES 2 578 903 A1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1170)

<400> 6  
 gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacgtcccc gagaagttgg ggggaggggt 60  
 cggcaattga accggtgcct agagaaggtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt 120  
 gtactggctc cgcctttttc ccgaggggtg gggagaaccg tatataagtg cagtagtcgc 180  
 cgtgaacgtt ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca caggtaagtg ccgtgtgtgg 240  
 ttcccgcggg cctggcctct ttacgggtta tggcccttgc gtgccttgaa ttactttccac 300  
 tggctgcagt acgtgattct tgatcccag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg 360  
 aggccttgcg cttaaggagc cccttcgcct cgtgcttgag ttgaggcctg gcctgggcgc 420  
 tggggccgcc gcgtgcgaat ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc tttcgataag 480  
 tctctagcca tttaaaattt ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg gcaagatagt 540  
 cttgtaaagc cgggccaaga tctgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcgggcggc 600  
 gacggggccc gtgctgccc ggcacatgt tcggcgaggc ggggcctgag agcgcgggcca 660  
 ccgagaatcg gacgggggta gtctcaagct ggccggcctg ctctggtgcc tggcctcgcg 720  
 ccgccgtgta tcgccccgcc ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgcgtga 780  
 gcggaagat ggccgcttc cggccctgct gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc 840  
 tcgggagagc gggcgggtga gtcaccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc 900  
 gtcgcttcat gtgactccac ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg 960  
 agcttttgga gtacgtcgtc tttaggttg ggggaggggt tttatgcat ggagtttccc 1020  
 cacactgagt ggggtggagac tgaagttagg ccagcttggc acttgatgta attctccttg 1080  
 gaatttgccc tttttgagtt tggatcttgg ttcatttca agcctcagac agtggttcaa 1140  
 agttttttc ttccatttca ggtgtcgtga 1170

<210> 7  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> oligonucleótido empleado para la generación del plásmido pWPI-PL

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(24)

<400> 7  
 aaactaggat cctaacgcgt catt 24

<210> 8  
 <211> 26  
 <212> DNA

ES 2 578 903 A1

<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> oligonucleótido empleado para la generación del plásmido pWPI-PL  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(26)  
<223> oligonucleótido empleado para la generación del plásmido pWPI-PL  
  
<400> 8  
cgaatgacgc gttaggatcc tagttt 26  
  
<210> 9  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> oligonucleótidos empleados en las PCRs en la SABT2  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(18)  
  
<400> 9  
ggtcagggtg tcttcttc 18  
  
<210> 10  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Oligonucleotido para PCR Sabt2  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(27)  
  
<400> 10  
gctcgagggt cggagatggt tgttatg 27  
  
<210> 11  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> oligonucleotido para PCR SABT2  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(18)  
  
<400> 11  
cgccgagcc tcccagtc 18  
  
<210> 12  
<211> 28

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotidos para PCR SABT2  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(28)  
  
 <400> 12  
 gacgcgtttc tctccagaac cggctcttc 28  
  
 <210> 13  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotidos para PCR CRE  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(26)  
  
 <400> 13  
 gctcgagatg tccaatttac tgaccg 26  
  
 <210> 14  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleotido para PCR CRE  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(25)  
  
 <400> 14  
 cacgcgtcta atcgccatct tccag 25