

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 484**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.1999 E 10172183 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2292778**

54 Título: **Utilización de secuencias de lentivirus de estructura triple para la importación nuclear de secuencias nucleotídicas**

30 Prioridad:

24.04.1998 FR 9805197

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

31.03.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (33.3%)
25-28 rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CHARNEAU, PIERRE;
ZENNOU, VÉRONIQUE y
FIRAT, HÜSEYİN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 607 484 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

Utilización de secuencias de lentivirus de estructura triple para la importación nuclear de secuencias nucleotídicas

5 La presente solicitud tiene por objeto la utilización de secuencias de ADN susceptibles de presentar una estructura u organización con tres cadenas (llamada "ADN triple"), para la transferencia de secuencias de nucleótidos a las células, así como de los vectores recombinantes que contienen estas secuencias triples.

10 La invención se refiere al uso de un polinucleótido para la fabricación de un vector plásmido recombinante destinado a la producción, mediante cotransfección de plásmidos de trancomplementación, de partículas lentivirales recombinantes desprovistas de genes lentivirales y destinadas a la transducción a células eucariotas diana de una secuencia de nucleótidos de interés, partículas donde dicho polinucleótido es el determinante de importación nuclear, estando dicho polinucleótido derivado de un lentivirus y constituido por una región activa en cis de iniciación central (cPPT) que contiene al menos 10 nucleótidos, de una región activa en cis de terminación (CTS) que contiene al menos 10 nucleótidos, y una concatenación interna de nucleótidos flanqueada por dos regiones, constituyendo dicha región CTS y dicha concatenación interna de nucleótidos una secuencia que tiene un tamaño de 80 a 120 nucleótidos, siendo capaz dicho nucleótido de formar una estructura de triplete durante la retrotranscripción del genoma de dichas partículas en la célula eucariota diana, estando dicho plásmido desprovisto de genes lentivirales y que comprende una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende (i) dicha secuencia de nucleótidos de interés puesta bajo el control de señales reguladoras de la transcripción y de la expresión, (ii) señales reguladoras de retrotranscripción, de expresión y de encapsulación derivadas de un lentivirus y (iii) dicho polinucleótidos, cuyas regiones activas en cis citadas están insertadas en una orientación funcional con dichas señales reguladoras derivadas de un lentivirus.

25 La solicitud tiene por objeto, por lo tanto, la definición y el suministro de nuevos medios susceptibles de ser empleados, por ejemplo, en el marco de protocolos de terapia génica o de transgénesis para la creación de animales o de plantas transgénicas o también de células o líneas celulares recombinantes. Estos medios comprenden la elaboración de nuevos vectores susceptibles de transferir una secuencia de nucleótidos y, en particular, una secuencia de interés terapéutico, a células diana del cuerpo humano o animal.

30 Una limitación importante de los enfoques de terapia génica conocidos hasta ahora, se basa en la vectorización del gen de interés terapéutico. Los vectores retrovirales derivados de oncovirus, principalmente del VLMMo, han sido ampliamente utilizados para la transferencia de genes. Su aplicación está muy limitada por el hecho de que los oncovirus solamente se integran en células diana en división activa. Por el contrario, los lentivirus tienen la capacidad única, entre los retrovirus, de infectar células diferenciadas, no mitóticas, y representan candidatos virales interesantes para el desarrollo de nuevos vectores. Al tiempo que conservan las ventajas de un vector oncoviral (ausencia de inmunogenicidad, integración estable), los vectores lentivirales podrían permitir la transducción *in vivo* de tejidos diferenciados no mitóticos (cerebro, músculo, hígado, pulmón...) y encontrar de este modo un campo de aplicación considerable en terapia génica.

40 Se han descrito diferentes tentativas de construcción de vectores retrovirales a partir de lentivirus. Se mencionarán a este respecto los trabajos de Poznansky M. et al (J. Virol 1991, 65, 532-6), de Naldini et al (Science, 1996, 272, p 263-7) realizados a partir del retrovirus VIH y los de Poeschla EM et al (Nature Medicine, 1998, 4, p 354-7) realizados a partir del retrovirus VIF.

45 Reiser J. et al (PNAS 1996, 93, 15266-71) describen la construcción de vectores lentivirales derivados de VIH-1 y eliminados de una parte del gen env que está sustituida por una secuencia de nucleótidos de interés vinculada que codifica los genes marcadores Neo o HSA. Estos vectores conservan las secuencias LTR gag pol de VIH-1 que comprenden las secuencias correspondientes a los genes pol y vif intactos. Estos vectores se utilizan para a transferencia de secuencias lentivirales y de marcadores a células mitóticas o no mitóticas. La expresión de los marcadores y el análisis del ADN demuestran que las secuencias correspondientes se han integrado en el genoma contenido en el núcleo y, por tanto, se habían importado previamente al núcleo.

55 Los inventores han buscado determinantes implicados en el mecanismo de entrada del genoma retroviral en el núcleo de las células infectadas (mecanismo de importación nuclear).

60 La identificación de un determinante ADN triple esencial para la importación condujo a los inventores a definir nuevos medios y, en particular, vectores utilizables para la transferencia de genes o, de forma más general, de secuencias de nucleótidos (designadas en lo sucesivo mediante la expresión "transgenes") en células diana. Los inventores han trabajado en particular a partir del retrovirus VIH ("*human immunodeficiency virus*" [virus de la inmunodeficiencia humana] o HIV), miembro de la familia de los lentivirus y han identificado y aislado un determinante viral responsable de la importación nuclear del ADN proviral de VIH en las células diana: el ADN triple central. Este ADN triple ha demostrado ser capaz de funcionar en vectores, fuera del contexto natural del genoma de VIH1, como determinante de importación nuclear que permite la entrada del genoma del vector en el núcleo de células diana.

Los mecanismos de entrada del ADN retroviral en el núcleo comprenden diferencias considerables de una familia retroviral a otra. El genoma de los lentivirus es capaz de atravesar la membrana nuclear del núcleo interfásico mediante el direccionamiento y a continuación la translocación de su complejo de pre-integración (ADN lineal y proteínas asociadas) a través del poro nuclear. De este modo, estos virus son capaces de replicarse en ausencia de
 5 división de la célula diana. Estos virus infectan en particular a los macrófagos tisulares diferenciados y las células dendríticas, células en el centro de la transmisión, de la diseminación, y de la fisiopatología del VIH. Por el contrario, los genomas de los oncovirus y de los espumavirus son incapaces de atravesar la barrera que representa la membrana nuclear. Su complejo de pre-integración debe esperar a la mitosis y la desorganización de la membrana nuclear, para acceder a los cromosomas mitóticos e integrarse.

10 Los determinantes virales responsables de la importación nuclear del ADN del virus VIH1 han sido buscados por los inventores. La identificación y la comprensión funcional de los mecanismos moleculares de la importación nuclear del complejo de pre-integración de VIH presentan, en efecto, importantes intereses fundamentales. Los inventores han identificado un mecanismo original de importación nuclear del genoma de VIH-1 según el cual esta importación
 15 estaría controlada por una estructura de ADN, una cadena triple en el centro de las moléculas de ADN lineales, generada mediante etapas particulares de la transcripción inversa lentiviral.

La estructura de ADN triple presente en el centro de las moléculas de ADN lineales generadas durante la transcripción inversa lentiviral, en particular en el retrovirus VIH, ha sido descrita por los inventores en diferentes publicaciones anteriores (Charneau P. et al., J. Mol. Biol. 1994, 241, 651-662; Chameau P. et al, Journal of Virology, mayo de 1991, p. 2415-2421; Chameau P. et al, Journal of Virology, 1992, vol. 66, p. 2814-2820.

La estructura de ADN que forma una cadena triple durante la transcripción inversa viral, es un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central, o fragmento o "tracto" de polipurina (cPPT), y una región
 25 activa en cis de terminación (CTS), permitiendo estas regiones la iniciación de la transcripción de una cadena+ cuya síntesis es iniciada por la región PPT presente en el centro del genoma de VIH o de otros lentivirus, y la interrupción de la síntesis de una segunda cadena+, cuya síntesis es iniciada a nivel de un sitio PPT 3' cadena arriba de la LTR retroviral (figura 1).

30 La formación de la estructura de ADN triple es la consecuencia de un suceso de desplazamiento de cadena discreto en el genoma del retrovirus, bloqueado por la secuencia CTS (Charneau et al, J. Mol. Biol., 1994).

Se entiende que la expresión "ADN triple" utilizada en este documento designa una región de ADN de tres cadenas, sin referencia a la estructuración de estas cadenas entre sí (cadena desplazada libre, o formando una triple hélice o un bucle D. etc.).

La estructura de ADN triple formada de este modo durante la transcripción inversa permite o, como mínimo, contribuye a la entrada del genoma retroviral en el núcleo de la célula, permitiendo debido a esto la infección de células no mitóticas.

40 A partir de la identificación de este mecanismo requerido para la entrada de retrovirus en el núcleo de las células diana, los inventores elaboraron una nueva generación de vector lentiviral, que incluye la región ADN triple. La introducción de un fragmento de ADN, obtenido del genoma VIH-1 y que comprende las secuencias cPPT y CTS activas en cis, en un sistema de vector VIH, aumenta la transducción de genes en las células estimulando la tasa de
 45 importación nuclear del ADN del vector. Esta generación de vectores lentivirales de cadena triple mejora notablemente la transducción de genes en células mitóticas o no.

una secuencia nucleotídica de origen retroviral o similar a retroviral, que puede prepararse de manera sintética, que comprende regiones cPPT y CTS activas en cis en la transcripción inversa en general, y en particular 2
 50 polinucleótidos asociados cuando se colocan en el genoma retroviral normal, conteniendo estos polinucleótidos al menos 10 nucleótidos cada uno.

Esta secuencia nucleotídica comprende (véase la figura 11G donde se enmarcan las secuencias de interés activas en cis) por un lado una secuencia nucleotídica corta llamada cPPT en el caso del VIH1 (como mínimo 10 pares de bases) y por el otro una secuencia llamada "CTS" de al menos 10 pares de bases en el caso del VIH1. Las dos secuencias activas en cis y una secuencia nucleotídica obtenida del genoma retroviral y situada entre estas dos secuencias cis corresponden a aproximadamente 120 nucleótidos en el caso del genoma de VIH1 natural.

La solicitud describe también una secuencia nucleotídica que comprende tres cadenas de ADN constituidas por, por un lado, la región CTS (o una región equivalente en el caso de un origen del genoma utilizado diferente del de VIH1 pero que tiene las mismas propiedades que la región CTS publicada por Charneau et al, J. Mol. Biol., 1994 y, por otro lado, cadena arriba de CTS, una región que tiene aproximadamente de 90 a 110 nucleótidos, preferiblemente 99 nucleótidos en el caso del VIH1.

65 La solicitud describe un polinucleótido que comprende un fragmento de ADN de dos cadenas correspondiente a la región cPPT ("*polypurine tract*") asociada a una secuencia polinucleotídica presente de forma natural en el genoma

de VIH1 (o una secuencia equivalente natural o sintética) y finalmente una región CTS nucleotídica que adopta una conformación que define el final de la región de tres cadenas (lado 3') después de la transcripción inversa.

Esta conformación con tres cadenas se denomina "secuencia triple".

5 Como ejemplo, la secuencia triple es la que figura en la figura 11 F para VIH1 o en la figura 11G. La triple cadena, *in vivo*, cuando está presente en un vector utilizable para la penetración en las membranas nucleares de células eucariotas, estimula la importación de ADN en el núcleo de la célula a modificar o a transducir.

10 La solicitud describe la utilización de esta secuencia triple en solitario o en un vector para introducir secuencias nucleotídicas a las que está unida la secuencia triple en el núcleo de la célula eucariota receptora.

La solicitud describe de este modo un vector recombinante caracterizado por que comprende un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS),
15 siendo estas regiones de origen lentiviral o de tipo lentiviral, comprendiendo dicho vector, además, una secuencia de nucleótidos determinada (transgén o secuencia de interés y señales de regulación de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación de origen lentiviral o de tipo lentiviral.

20 El término "polinucleótido" utilizado se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico, en forma de cadena sencilla o cadena doble o cadena triple, ya se trate de ADN, por ejemplo, de ADNc, o de ARN.

Como ejemplo, la invención tiene por objeto la transferencia de transgenes con objetivos terapéuticos, en particular en el marco de protocolos de terapia génica somática, para insertar una secuencia de nucleótidos moduladora o reparadora de una actividad deficiente en las células somáticas de un organismo para remediar el mal
25 funcionamiento de un gen endógeno, o para permitir la expresión de una función suplementaria, particularmente de una función supresora de la expresión o de la actividad de un gen, con un objetivo terapéutico.

30 Por la expresión "terapéutico", se entiende la búsqueda o la obtención de un efecto preventivo o curativo, o también la búsqueda o la obtención de una mejoría o de una estabilización del estado patológico de un paciente.

En el marco de la invención, y como ejemplo, las secuencias nucleotídicas llamadas transgenes o secuencias nucleotídicas de interés pueden ser, por lo tanto, genes o parte de genes o secuencias derivadas de genes, por ejemplo, ADNc o ARN. Pueden tratarse de secuencias antisentido, de secuencias mutantes negativas de un gen
35 dado, o de secuencias que intervienen en las funciones de transcripción, de expresión, de activación de genes, o también secuencias apropiadas para la activación de profármacos o de sustancias citotóxicas.

Las secuencias de transgenes en el marco de la invención también pueden tener una actividad de estimulación o de inducción de la respuesta inmunitaria, celular o humoral, por ejemplo, cuando se utilizan para transformar células presentadoras del antígeno.
40

De este modo, la invención se puede aplicar a la preparación de vectores utilizables con vistas a una terapia génica en campos variados tales como el de las enfermedades hereditarias que comprende la alteración de un gen, comprendiendo estas enfermedades por ejemplo la miopatía de Duchenne, mucoviscidosis, enfermedades neurodegenerativas o también patologías adquiridas tales como patologías malignas que conducen de forma natural
45 a una respuesta débil del sistema inmunitario. La invención permite también prevenir tratamientos de inmunoterapia para estimular la respuesta a agentes patógenos, por ejemplo, mediante la producción de CTL, por ejemplo, en el caso de patologías tales como cánceres o patologías tales como el SIDA, o disminuir la respuesta contra los antígenos propios en el caso de enfermedades auto-inmunes.

50 La demanda describe también el suministro de medios que permiten la elaboración de composiciones inmunógenas o de vacunas, profilácticas o terapéuticas, o de composiciones inmunógenas.

Los vectores lentivirales que contiene un ADN triple de acuerdo con la divulgación también se utilizan para la construcción de animales transgénicos, mediante la transducción de genes en líneas o células embrionarias.
55

El vector utilizado en la invención contiene un transgén insertado bajo el control de secuencias reguladoras de transcripción o de expresión, virales o no.

60 El transgén puede estar incluido en una casete de expresión que comprende las secuencias apropiadas para la regulación de su expresión en una célula.

El vector recombinante se caracteriza por que las secuencias de origen retroviral que contiene se derivan del genoma de un lentivirus.

65 En el marco de la presente solicitud, el término "derivado" engloba cualquier secuencia idéntica a la secuencia contenida en el genoma del retrovirus, o cualquier secuencia modificada por mutación, inserción, delección,

recombinación, siempre que ésta conserve la función esencial que posee en el genoma retroviral, con vistas a su inserción en el vector de la invención.

5 Dicha secuencia podrá obtenerse mediante cualquier medio conocido en sí mismo que permita la identificación y el aislamiento de secuencias de nucleótidos a partir de su organismo de origen, comprendiendo en particular etapas de clonación y/o de amplificación, o mediante síntesis de acuerdo con cualquier otra técnica disponible.

10 El vector recombinante descrito de este modo puede ser, por ejemplo, un plásmido recombinado mediante una construcción lentiviral o de tipo lentiviral y un transgén, llegado el caso contenido en una casete de expresión.

Dicho vector es utilizable para la transducción de células, y en particular de células de encapsidación o/y de células diana, mediante cualquier método conocido por sí mismo, que incluye la transfección o la infección o la transducción, por ejemplo, mediante un vector adenovirus o de tipo AAV que contiene el vector lentiviral de cadena triple.

15 Un vector de acuerdo con la invención se define, de este modo, en que es transcomplementado por uno o más vectores adicionales que aportan las secuencias que codifican los polipéptidos de estructura del genoma de un retrovirus seleccionado, en particular de un lentivirus, o los polipéptidos de estructura de un retrotransposón.

20 A este respecto, el vector obtenido de acuerdo con la invención es transcomplementado mediante la aportación de secuencias que codifican los polipéptidos GAG, POL y ENV o una parte de estos polipéptidos suficiente para permitir la formación de partículas retrovirales destinadas a vectorizar el vector recombinante desprovisto de los genes virales y que comprende el transgén cuya expresión se busca.

25 Un vector de acuerdo con la invención puede caracterizarse por el hecho de que el transgén o la secuencia de interés está contenido(a) en una casete de expresión que comprende señales reguladoras de transcripción y de expresión.

30 De forma general, el vector o vectores utilizados para la transcomplementación en proteínas retrovirales o similares a retrovirales, están desprovistos de señales de encapsidación.

A este respecto, se mencionarán los vectores preparados de acuerdo con las técnicas de Goldman et al (1997) utilizables para la transcomplementación de un vector recombinante de acuerdo con la invención.

La solicitud describe también partículas de vector retrovirales recombinantes que comprenden:

- 35 a) un polipéptido gag correspondiente a nucleoproteínas de un lentivirus o a polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos GAG),
 b) un polipéptido pol constituido por las proteínas RT, PRO, IN de un lentivirus o un polipéptido derivado funcional (polipéptido POL),
 40 c) un polipéptido de envuelta o polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos ENV),
 d) una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos determinada (transgén o una secuencia de interés) situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión, una secuencia que contiene señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación de origen retroviral o similar a retroviral y un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS), siendo estas regiones de origen retroviral o similar a retroviral y estando insertadas en una orientación funcional con dichas señales reguladoras de origen retroviral o similar a retroviral mencionadas anteriormente.

La solicitud describe también partículas de vector retrovirales recombinantes que comprenden:

- 50 a) una secuencia de nucleótidos llamada secuencia gag que codifica las nucleoproteínas de un lentivirus o los polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos GAG),
 b) una secuencia de nucleótidos llamada secuencia pol que codifica las proteínas RT, PRO, IN y RN de un lentivirus o un polipéptido derivado funcional (polipéptido POL),
 55 c) señales reguladoras de transcripción y de expresión de las secuencias gag y pol,
 d) una secuencia de nucleótidos llamada secuencia env que codifica polipéptidos de envuelta o polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos ENV), estando la secuencia env situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión,
 60 e) una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos determinada (transgén), situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión, una secuencia que contiene señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación de origen retroviral o similar a retroviral y un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS), siendo estas regiones de origen retroviral o similar a retroviral, estando estas regiones insertadas en una orientación funcional con las señales reguladoras de origen retroviral o similar a retroviral.

65

La invención tiene por objeto el uso de un polinucleótido de tipo lentiviral, enmarcando cada una de estas dos regiones una sucesión de nucleótidos interna, estando las regiones activas en cis mencionadas anteriormente cPPT y CTS en la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente, en una orientación funcional con señales reguladoras de transcripción inversa de origen lentiviral o de tipo lentiviral.

5 Los polipéptidos GAG y POL son los polipéptidos de nucleoproteína obtenidos de precursores escindidos por la proteasa viral. Los polipéptidos POL comprenden la transcriptasa inversa (RT), la proteasa (PRO), la integrasa (IN) y la ARNasa H (RN) del retrovirus. Llegado el caso, otras proteínas del retrovirus también se utilizan para la construcción de las partículas de vector. Se observa que los términos proteínas o polipéptidos utilizados abarcan las formas no glucosiladas o las formas glucosiladas de los polipéptidos en cuestión.

15 Las secuencias gag, pol y env utilizadas para la construcción de las partículas de vector retrovirales pueden ser, llegado el caso, modificadas mediante mutación, por ejemplo mediante mutación puntual o mediante delección o inserción de uno o más nucleótidos, u obtenidas de quimeras recombinantes procedentes de diferentes retrovirus por ejemplo entre VIH1 y VIH2 o VIH1 y VEAC (*Caprine Arthritis Encephalitis Virus*) [virus de la encefalitis-artritis caprina], siempre que permitan la producción de polipéptidos funcionales para la producción de partículas virales capaces de vectorizar el transgén a expresar. En particular, se recurrirá a secuencias mutadas para aumentar la seguridad del retrovirus producido de este modo.

20 Ventajosamente, el vector recombinante obtenido de acuerdo con la invención o las partículas de vector recombinantes son tales que el transgén está bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión de origen no retroviral. Un promotor susceptible de ser utilizado para controlar la expresión del transgén, es, por ejemplo, el promotor del CMV, el promotor PGK o EF1 α descrito en Tripathy, SK et al. (PNAS 1994, 91, p 11557-11561).

25 De acuerdo con una variante de realización de la invención, el transgén puede estar, sin embargo, situado bajo el control de las señales reguladoras identificadas anteriormente como de origen retroviral o similar a retroviral, en particular bajo el control de la secuencia LTR.

30 Un lentivirus utilizado para derivar la construcción retroviral de acuerdo con la invención puede seleccionarse entre los retrovirus VIH, por ejemplo, VIH-1, VIH-2 o cualquier aislado diferente de estos dos tipos, o por ejemplo entre los virus VEAC (*Caprine Arthritis Encephalitis Virus*), VAIE (*Equine Infectious Anemia Virus*) [virus de anemia infecciosa equina], VISNA, VIS (*Simian Immunodeficiency Virus*) [virus de inmunodeficiencia simia] o VIF (*Feline Immunodeficiency Virus*).

35 Un vector particularmente ventajoso de acuerdo con la invención es el vector caracterizado por que el polinucleótido es una secuencia de ADN que comprende la región activa en cis de iniciación central (cPPT) y la región de terminación (CTS) del genoma de un retrovirus VIH-1, o de cualquier otro lentivirus.

40 La secuencia PPT central o cPPT es una secuencia relativamente conservada en los lentivirus y se identifica por la presencia de numerosos restos de purina de los que algunos se muestran en la figura 11H. Mutaciones, incluso puntuales, en una de estas regiones, pueden abolir su carácter funcional vinculado a la formación de las estructuras de ADN triple.

45 La identificación de las secuencias cPPT está facilitada por el hecho de que se trata de repetición en el centro del genoma en los lentivirus, de una secuencia de polipurina situada en el extremo cadena arriba (5') de LTR 3' en todos los retrovirus. Esta secuencia cPPT puede ser una repetición exacta, como en el caso del virus VIH-1, o estar ligeramente modificada en otros lentivirus (figura 11H). La secuencia de terminación central CTS se caracteriza en el caso del virus VIH-1 (Charneau et al, 1994). Ésta está situada a una centena de nucleótidos cadena abajo de la secuencia cPPT. Se encuentran en los otros lentivirus secuencias CTS candidatas, también en este caso a una centena de nucleótidos (de 80 a 120 nucleótidos) cadena abajo de la secuencia cPPT. La posición probable de la secuencia CTS se indica en algunos lentivirus en las figuras 11A a 11E.

55 La secuencia CTS del lentivirus VAIE ha sido caracterizada recientemente (Scott R. Stetor et al., Biochemistry 1999, 38, P 3656-67). De acuerdo con estos autores, en el VAIE, las secuencias cPPT y CTS son respectivamente 5' AAC AAA GGG AGG GA 3' y 5' AAA AAA TTT TGT TTT TAC AAA ATC 3'.

60 Entre los polinucleótidos preferidos utilizables en el marco de la invención, se mencionan, por ejemplo, las secuencias representadas en la figura 11 y, de forma más precisa, las secuencias comprendidas entre las dos regiones cPPT y CTS, que incluyen las secuencias de dichas regiones.

Llegado el caso, la secuencia de nucleótidos que comprende la cPPT, el polinucleótido interno (es decir que une la cPPT hasta la secuencia CTS) y la secuencia CTS, puede mutarse puntualmente, o mutarse por delección o inserción de nucleótidos. Como ejemplo, se realizaron mutaciones puntuales en la secuencia cPPT de VIH1 y se demostró que había mantenimiento de una infectividad residual en las células (Charneau et al, J. Virol. 1992, 66, p. 2814-2820).

La invención abarca el uso de cualquier secuencia mutada para cPPT o CTS que tiene al menos el 60 % de identidad con la secuencia nucleotídica activa en cis homóloga natural de la que se obtiene. En el caso de secuencias activas en cis quiméricas, el porcentaje se aplica a cada secuencia nucleotídica mutada de la quimera.

- 5 Pueden introducirse modificaciones de la secuencia nucleotídica de las regiones PPT o cPPT o CTS para construir el ADN triple de acuerdo con la invención. Estas modificaciones pueden alcanzar hasta el 40 % de la secuencia natural.

- 10 La identidad de las secuencias nucleotídicas variantes con respecto a las secuencias llamadas naturales, se calcula estrictamente con respecto a cPPT o a CTS individualmente y con respecto a la secuencia nucleotídica del ADN triple completo.

- 15 La región comprendida entre cPPT y CTS, está constituida por un polinucleótido que puede ser el que se encuentra en el genoma retroviral de origen entre CTS y PPT o ser diferente de éste a condición de que el ADN triple conserve sus propiedades en la importación nuclear del polinucleótido que permite llevar a la secuencia nucleotídica de interés al interior del núcleo.

- 20 El polinucleótido descrito en la solicitud puede introducirse en un vector replicativo o no replicativo. En el caso de un vector retroviral, se trata de un vector de tipo no replicativo.

Para la preparación de cantidades importantes de partículas de vector retroviral, es posible utilizar vectores de tipo adenoviral donde se ha introducido el polinucleótido correspondiente al genoma retroviral que contiene las secuencias de ADN triple y las de los genes gag, pol y env.

- 25 Estos vectores adenovirales pueden hacerse eventualmente replicativos mediante la introducción de una secuencia origen de replicación.

En la figura 11G, las secuencias cPPT y CTS del VIH-1 están enmarcadas.

- 30 En todo caso, se utilizarán secuencias mutadas que conserven la capacidad de formar una cadena triple de ADN durante la transcripción inversa del genoma en la célula diana.

- 35 Un vector recombinante de acuerdo con una realización particular de la invención puede comprender, por lo tanto, todas o parte de las secuencias LTR retrovirales o de retrotransposón, los sitios retrovirales PBS, y PPT 3'-terminal, la secuencia retroviral necesaria para la encapsidación del genoma del vector en la partícula de vector. La secuencia LTR puede estar en parte deletada, particularmente en la región U3.

- 40 Un vector particular es el plásmido pTRIP.EGFP, depositado en la CNCM (*Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur* [Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur], Francia) el 15 de abril de 1998, con el número I-2005. El mapa de restricción de este vector se representa en la figura 10.

- 45 Otro vector es el plásmido pTRIP.MEL-IRES-GFP depositado en la CNCM el 20 de abril de 1999 con el nº I-2185. Este vector es el plásmido pTRIP.MEL-IRES-GFP representado en la figura 14.

Un vector recombinante particular descrito en la solicitud se caracteriza por que las secuencias gag, pol y env también se derivan de las secuencias de un lentivirus, en particular de un retrovirus VIH, en particular VIH-1 o VIH-2.

- 50 De acuerdo con otra realización de la invención, las secuencias gag y pol se derivan de un retrovirus VIH y la secuencia env se deriva de un retrovirus distinto de VIH o de un virus, por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular (VEV).

- 55 De forma general y en función de la expresión del transgén que se busca, se tomará la decisión de recurrir a una secuencia env que codifica polipéptidos env anfótrofos con respecto al huésped donde se desea expresar el transgén o, por el contrario, se seleccionarán secuencias env que codifican polipéptidos env ecótrofos. El tropismo de la secuencia env puede ser un tropismo específicamente humano.

- 60 La solicitud describe también partículas de vector recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos determinada (transgén o secuencia de interés), situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión, señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación y un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS).

- 65 La solicitud describe también partículas de vector recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos determinada (transgén), situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión, señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de

encapsidación de retrotransposón y un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS), siendo estas regiones derivadas de un retrotransposón y estando insertadas en una orientación funcional con las señales reguladoras de retrotransposón.

5 Además, la demanda describe también partículas de vector recombinantes que comprenden:

- a) un polipéptido GAG correspondiente a las nucleoproteínas de un retrotransposón o a polipéptidos derivados funcionales,
- 10 b) un polipéptido POL correspondiente a las proteínas RT, PRO, IN de un retrotransposón o a un polipéptido derivado funcional,
- c) señales reguladoras de transcripción, y de expresión de las secuencias gag y pol,
- d) una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos determinada (transgén), situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión, una secuencia que contiene señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación de retrotransposón y un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS), siendo estas regiones derivadas de un retrotransposón y estando insertadas en una orientación funcional con las señales reguladoras de retrotransposón.

20 Además, la solicitud describe también partículas de vector recombinantes que resultan de la expresión de:

- a) una secuencia de nucleótidos llamada secuencia gag que codifica las nucleoproteínas de un retrotransposón o polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos GAG),
- b) una secuencia de nucleótidos llamada secuencia pol que codifica la proteína RT, PRO e IN de un retrotransposón o un polipéptido derivado funcional (polipéptido POL),
- 25 c) señales reguladoras de transcripción y de expresión de las secuencias gag y pol, comprendiendo dichas partículas una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos determinada (transgén), situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión, una secuencia que contiene señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación de retrotransposón y un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS), siendo estas regiones derivadas de un retrotransposón y estando insertadas en una orientación funcional con las señales reguladoras de retrotransposón.

La solicitud describe también partículas similares a retrovirales recombinantes que comprenden:

- 35 a) un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS), siendo estas regiones derivadas de un retrotransposón y estando insertadas en una orientación funcional con las señales reguladoras de retrotransposón,
- b) un polipéptido correspondiente a las nucleoproteínas de un retrotransposón o a polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos GAG),
- 40 c) un polipéptido pol correspondiente a proteínas RT, PRO, IN de un retrotransposón o un polipéptido derivado funcional (polipéptido POL),
- d) un polipéptido de envuelta viral,
- e) una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos determinada (transgén o secuencia de interés), situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y de expresión, señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación de retrotransposón.

50 La demanda describe, por ejemplo, a un vector recombinante tal como se ha definido anteriormente, donde las señales reguladoras de transcripción inversa, de expresión y de encapsidación y el polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS, se derivan de un retrotransposón, por ejemplo, de un retrotransposón de levadura.

De forma general, las señales reguladoras de transcripción y de expresión del transgén o de las secuencias que codifican los polipéptidos de estructura de las partículas de vector, cuando no son de origen retroviral o similar a retroviral, son ventajosamente señales inducibles o condicionales, susceptibles de conducir a una expresión específica de tejido.

55 También se describen células recombinantes caracterizadas por que se recombinan con un vector de acuerdo con una de las definiciones anteriores. La recombinación puede realizarse mediante cualquier medio disponible, y en particular mediante transfección o mediante infección, particularmente mediante transfección o mediante transducción con un vector.

60 Las células, de este modo, pueden ser transfectadas de forma transitoria o, por el contrario, de forma estable. Puede tratarse de células de encapsidación o de células diana, en particular de células donde se busca un efecto terapéutico mediante la expresión del transgén.

65 De forma particularmente interesante, las células recombinantes capaces de expresar el transgén gracias a la transducción con ayuda de un vector de la invención, son células eucariotas diferenciadas no mitóticas.

La divulgación permite también, sin embargo, la preparación de células recombinantes eucariotas primarias no mitóticas, o también de células mitóticas.

A modo de ejemplo, se mencionarán las células de pulmón, células del cerebro, epiteliales, astrocitos, microglía, oligodendrocitos, neuronas, musculares, hepáticas, dendríticas, neuronales, células de la médula ósea, macrófagos, fibroblastos, linfocitos y células hematopoyéticas.

La solicitud describe, por lo tanto, composiciones con objetivo terapéutico, caracterizadas por que comprenden un vector tal como se ha descrito anteriormente, o una célula recombinante definida de acuerdo con las indicaciones anteriores.

La invención también se refiere a una composición inmunógena que comprende un vector tal como se ha descrito anteriormente o células recombinantes definidas anteriormente, siendo dicha composición susceptible de conducir a una respuesta inmunitaria, celular o humoral en un huésped determinado.

La solicitud describe por tanto un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente, que comprende regiones cPPT y CTS lentivirales o de tipo lentiviral, y da acceso a su utilización para la importación nuclear, particularmente ex vivo en células determinadas, de una secuencia de nucleótidos (transgén).

Además, la divulgación pone a disposición un polinucleótido tal como se ha descrito anteriormente está asociado a una secuencia nucleotídica de interés o a un transgén.

Finalmente, la solicitud describe la utilización de un polinucleótido que comprende una región activa en cis de iniciación central (cPPT) y una región activa en cis de terminación (CTS), siendo estas regiones de origen lentiviral o de tipo lentiviral, para la transfección o la transducción de células eucariotas con un transgén o un polinucleótido de interés.

La invención también describe la utilización de un vector recombinante o de un polinucleótido de la invención para la transducción in vivo.

Otras características y ventajas de la invención aparecen en los ejemplos y en las siguientes figuras.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Transcripción inversa de lentivirus

La transcripción inversa de los genomas lentivirales difiere de la de los retrovirus oncógenos por la síntesis de la cadena+ en dos mitades distintas. Un segmento cadena abajo se inicia a nivel de una copia central del fragmento o "tracto" de polipurina (cPPT), característico de los genomas lentivirales. La síntesis de la cadena+ cadena arriba se termina después de un desplazamiento de cadena discreto en el centro del genoma. El bloqueo del desplazamiento de cadena por la transcriptasa inversa está gobernado por una secuencia activa en cis a separar del genoma de VIH: la CTS (*Central Germination Sequence*) [secuencia de terminación central]. El producto final de la transcripción inversa de los lentivirus es un ADN lineal que porta una estructura de ADN central con tres cadenas (cadena triple central) en una longitud de una centena de nucleótidos.

Figura 2: Plásmidos utilizados para la producción de las partículas de vector VIH

Las partículas de vector son producidas por cotransfección de tres plásmidos: el plásmido vector que comprende (pTRIP) o no (pHR) las secuencias activas en cis responsables de la formación de cadenas triples, un plásmido de encapsidación que suministra en trans las proteínas estructurales y las enzimas de la partícula (pCMV Δ R8.2 o pCMV Δ R8.91, Naldini et al, 1996 y Zufferey et al, 1997), y un plásmido de expresión de la envuelta del virus VEV (VEV-G).

Solamente se presentan las partes pertinentes de los plásmidos cotransfectados en células Hela (Naldini et al PNAS octubre de 1996, Zufferey et al Nature Biotech. 1997).

Los plásmidos de encapsidación pCMV Δ R8.2 o pCMV Δ 8.91 permiten la expresión de las proteínas obtenidas de gag y pol.

pMD.G codifica la envuelta heteróloga de VEV. Los plásmidos vector pHR-TRIP se derivan del plásmido pHR'CMVlacZ (Naldini et al): una secuencia triple silvestre o mutante se ha insertado y el gen informador lacZ cambiado o no en EGFP.

Figura 3: Impacto de la cadena triple sobre la transducción de EGFP en células Hela

Células Hela, cultivadas en Labtek de 8 cámaras, son transducidas por diferentes vectores que expresan la proteína autofluorescente EGFP. Las infecciones se normalizan según la cantidad de proteína de la cápsida (kit ELISA P24 Dupont) a 2 ng de P24 por inóculo. A las 48 horas después de la infección, las células se fijan con PBS PFA al 1 %, se montan en mowiol, y a continuación se observan en el microscopio de fluorescencia. Se muestran tres campos independientes para el vector de origen sin cadena triple (HR.EGFP, en la parte superior), para el vector con la cadena triple (TRIP.EGFP, medio) o para un vector que contiene una secuencia triple mutada, no funcional (TRIP D.EGFP, en la parte inferior). A la derecha se muestran las diferentes transducciones

en presencia de nevirapina, un inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH-1.

Figura 4: Cuantificación de la tasa de transducción del gen de EGFP por los vectores VIH con o sin cadena triple

5 Células Hela transducidas por 2 ng P24 de los vectores EGFP con o sin cadena triple se tripsinizan a las 48 horas después de la infección. Los porcentajes de células positivas para la expresión de EGFP se calculan mediante citometría de flujo (canal FITC). En todos los casos, la transducción es inhibida en presencia de nevirapina, un inhibidor de la transcriptasa inversa del VIH-1. En la figura 4C, se observa la presencia del ADN triple en el vector estimulado por la transducción de GFP (u otro gen de interés) en las células en mitosis o no mitóticas. Esta transducción se multiplica por un factor 20 con respecto a los resultados obtenidos con vectores sin secuencia triple (por ejemplo, véase Naldini et al, Science, 1996).

Figura 5: Cuantificación de la tasa de transducción del gen LacZ por los vectores VIH con o sin cadena triple

15 El impacto de la cadena triple sobre la transducción se calcula mediante infección de células Hela, cultivadas en placas de 96 pocillos, mediante diferentes vectores que expresan el gen informador LacZ. A las 48 horas, después de la infección, las placas de cultivo se lisan y la actividad beta-Galactosidasa se mide según un kit de reacción luminiscente (Boehringer). Cada transducción se realiza por triplicado con un inóculo normalizado a 2 ng de P24.

20 Panel superior: Células Hela en proliferación.

Panel inferior: Células Hela bloqueadas en el ciclo por afidicolina.

La transducción del gen LacZ se multiplica por un factor 6 con un vector que contiene una secuencia triple con respecto a un vector sin secuencia triple.

Figura 6a y b: Impacto de la cadena triple sobre la transducción ex vivo del gen EGFP en células medulares primarias de rata

25 Células de explantes primarios de médula espinal de rata se infectan con 300 ng de P24 para cada vector con y sin cadena triple, y se observan en un microscopio de fluorescencia como anteriormente.

Figura 7: Impacto de la cadena triple sobre la transducción in vivo del gen de EGFP y del gen de luciferasa en el cerebro de rata

Figura 7-a-1: Transducción a nivel del sitio de inyección

35 La transferencia del gen EGFP se realiza mediante inyección directa en el cuerpo estriado del cerebro de rata de 2 microlitros de vector correspondiente a 50 ng de P24.

La observación de los cortes en microscopio de fluorescencia muestra una transducción importante de EGFP en presencia de la cadena triple (panel izquierdo), y muy reducida sin ella (panel derecho).

Figura 7-a-2: otra sección representativa del experimento descrito anteriormente.

Figura 7-b: **Cuantificación del impacto de la cadena triple sobre la transducción in vivo en el cerebro.**

40 Figura 7-b-1: Impacto de la cadena triple sobre la transducción del gen que codifica la luciferasa en las células Hela *in vitro*. El gráfico muestra la producción de luciferasa cuantificada mediante medición de luminiscencia (kit Promega®). La presencia de la cadena triple en el vector permite obtener un aumento de la transducción del gen de la luciferasa, de un factor 8.

45 Figura 7-b-2: *In vivo*, cuantificación de la actividad luciferasa en cerebros de rata después de la inyección de vectores que codifican la luciferasa, con o sin cadena triple. La presencia de cadena triple estimula la transducción de la luciferasa en un factor 8.

Figura 7-b-3: Mismo experimento que 7-b-2, pero realizado en ratones.

Figura 8: Estrategia de análisis de la tasa de importación nuclear del ADN del vector.

50 Se desarrolló un ensayo cuantitativo que permite seguir la cinética de transcripción inversa, la importación nuclear y la integración o la circularización del ADN del vector en las células transducidas. Este ensayo sustituye ventajosamente a la detección por amplificación por PCR de los círculos con dos LTR, marcadores de la importación nuclear del ADN viral en el núcleo de la célula infectada (Bukrinsky et al, Nature 1993. 365, p. 666-669). El ADN del vector lineal no integrado, los ADN circulares con una o dos LTR y el ADN del vector integrado se detectan mediante transferencia de Southern y se cuantifican en el Phosphorimager según la estrategia de digestión de restricción siguiente: el ADN total de las células transducidas es digerido por EcoNI y Avall (dos sitios únicos en el genoma del vector), y a continuación se hibrida con una sonda de ADN generada por PCR que abarca exactamente el sitio EcoNI. Esta sonda reacciona con diferentes fragmentos: el fragmento interno de 0,77 Kb, común a todas las formas de ADN del vector, y cuya cuantificación en el phosphorimager indica la cantidad total de ADN del vector transcrito inversamente, un fragmento distal de 1,16 Kb que indica específicamente la cantidad de ADN lineal no integrado. Después de una digestión suplementaria por la enzima XhoI, los círculos con una y dos LTR aparecen respectivamente a 1,4 Kb y 2 Kb. La cantidad de ADN del vector integrado se calcula restando a la señal correspondiente al ADN total transcrito inversamente las señales correspondientes al ADN del vector no integrado, ADN lineal y círculos. En el caso de un defecto de importación nuclear, el perfil esperado de ADN del vector en las células transducidas es una acumulación de ADN lineal no integrado. Por el contrario, si el ADN lineal del vector accede al compartimento nuclear de la célula, la parte esencial del ADN

lineal se integra en la cromatina celular y se circulariza.

Figura 9a: Análisis de la tasa de importación nuclear de los ADN del vector.

El análisis mediante transferencia de Southern, 48 horas después de la transducción en las células HeLa, muestra un defecto de importación nuclear típico en el caso del vector sin cadena triple (HR GFP) o que contiene la secuencia triple en orientación inversa, no funcional (TRIP. GFP inv). En el caso de estos vectores, la señal correspondiente al ADN lineal no integrado es equivalente a la señal de ADN total, lo que indica que la parte esencial del ADN del vector sigue en forma lineal en lugar de integrarse. En el caso del vector TRIP.GFP, la intensidad de la señal correspondiente al ADN lineal es muy inferior a la señal del ADN total, lo que indica que una fracción importante del ADN del vector ha sido importada al núcleo y se ha integrado en él.

Figura 9-b: Análisis cinético de la tasa de importación nuclear de los ADN del vector con cadena triple (TRIP-GFP) o sin secuencia triple (HR-GFP, TRIPinv-GFP).

Figura 9-c: Cuantificación del estado del ADN del vector en las células transducidas.

La cuantificación en phosphorimager de la transferencia de Southern mostrada en la figura 9b muestra que, a las 48 horas después de la transducción, la mayoría del ADN de los vectores sin cadena triple se encuentra en forma de ADN lineal no integrado, poco del ADN del vector se integra o se circulariza. Los vectores sin cadena triple (HR-GFP y TRIPinv-GFP) muestran un defecto de importación nuclear típico. Por el contrario, en el caso del vector TRIP-GFP, más del 60 % del ADN está integrado en el genoma de la célula transducida y poco ADN del vector subsiste en forma de ADN lineal no integrado. La introducción de la secuencia triple en el vector complementó el defecto de importación nuclear del vector HR-GFP hasta un nivel silvestre. En efecto, el perfil de ADN del vector obtenido en el caso del vector TRIP-GFP es comparable al de un virus VIH-1 silvestre. Este resultado demuestra que la secuencia triple es el único determinante de importación nuclear que falta en la construcción HR-GFP. Solamente la forma integrada del ADN del vector es activa.

Figura 10: Mapa de restricción del vector pTRIP.EGFP.

Figuras 11A - 11F: Secuencia de los polinucleótidos que comprenden las regiones cPPT y CTS de los virus VEAC, VAIE, VISNA, VISAGM, VIH-2_{ROD}, VIH-1_{LAI}.

La figura 11G representa la secuencia del ADN triple del virus VIH1. Las regiones activas en cis, cPPT y CTS, están delimitadas e impresas en caracteres en negrita mayúscula.

La figura 11H representa el alineamiento de las secuencias cPPT y PPT3' en algunos lentivirus. La línea de la parte superior corresponde a la secuencia PPT 3' presente en todos los retrovirus cadena arriba de LTR 3'. La línea de la parte inferior corresponde a la repetición interna de la secuencia PPT llamada cPPT en los lentivirus.

Figura 12:

La figura 12 representa la producción de CTL *in vitro* a partir de células dendríticas humanas transducidas por el vector triple que tiene como gen de interés un poliepitopo CTL de melanoma constituido por epítomos cuyas secuencias se describen en la figura 15.

Estas células dendríticas se ponen en contacto con células mononucleares (PBL₀). La actividad de CTL se mide después de la re-estimulación con los péptidos antigénicos correspondientes.

En el eje de abscisas, se representa la relación de células efectoras / células diana.

Figura 13: Respuesta citotóxica después de la inmunización de ratones con el vector TRIP.MEL-IRES-GFP.

Figura 14: Mapa de restricción del vector pTRIP.MEL-IRES-GFP

La cepa de *E. coli* que contiene el vector pTRIP-MEL-IRES-GFP se depositó el 20 de abril de 1999 en la CNCM y tiene el número de entrada n° I-2185.

Figura 15: Secuencias de los epítomos CTL HLA A2.1 específicos de melanoma incluidos en la construcción poliepitópica del vector TRIP.MEL-IRES-GFP. El subrayado de las secuencias del poliepitopo tiene por objeto individualizar cada epítopo.

Figura 16: Transducción de muy alta eficacia de las células madre CD34+ por los vectores de VIH con cadena triple.

Análisis mediante citometría de flujo FACS de la transducción del gen de GFP en las células madre hematopoyéticas CD34+ mediante el vector TRIP-GFP. El porcentaje de células CD34+ transducidas por el vector TRIP-GFP es superior al 85 %. Esta eficacia es notablemente más elevada que las tasas de transducciones obtenidas anteriormente con un vector de VIH sin cadena triple (HR-GFP) en las células CD34+ (Miyoshi H et al., Science 1999, 283, p 682-6).

MATERIAL Y MÉTODOS**Construcción de los plásmidos vectores:**

5 Los plásmidos pTRIP-LacZ y pTRIP-EGFP derivan de la construcción pHR'CMVlacZ (Naldini et al, 1996). El gen informador LacZ de pHR'CMVlacZ ha sido sustituido por el ORF (marco abierto de lectura) de la proteína autofluorescente EGFP. El gen de la EGFP ha sido amplificado por PCR a partir del plásmido pEGFP-N1 (Clontech) gracias a la polimerasa termoestable fiel Pfu (Stratagene).

Las secuencias de los cebadores de PCR utilizados son las siguientes:

10

Bam EGFP: 5' cc gga tcc cca ccg gtc gcc acc 3'
Xho EGFP: 5' cc ctc gag cta gag tcg cgg ccg 3'

La amplificación por PCR se realizó en 30 ciclos en las siguientes condiciones:

15

- Desnaturalización 95 °C, 30 segundos
- Hibridación 50 °C, 1 minuto
- Elongación 75 °C, 30 segundos

20 Los sitios de restricción BamHI y XhoI se añadieron en 5' y 3' respectivamente del fragmento PCR EGFP para insertarlo de forma orientada en el fragmento del vector pHR'CMV, digerido a su vez por BamHI y XhoI. La inserción del fragmento de PCR EGFP, mediante tecnologías convencionales de ADN recombinante (Maniatis et al, 1983), generó el plásmido pHR-EGFP.

25 Un fragmento de 184 pb correspondiente a la región central del genoma VIH-1 y que comprende las secuencias activas en cis cPPT y CTS, responsables de la formación de la cadena triple durante la transcripción inversa del VIH, se insertó en el sitio ClaI de los plásmidos pHR-EGFP y pHR'CMVlacZ, cadena arriba del promotor del CMV. La región central triple se amplificó por PCR a partir de plásmidos provirales completos del genoma VIH-1 LAI que comprende la secuencia triple silvestre (pBRU3; Chameau et al, 1991), mutada en la secuencia activa en cis de terminación CTS (pCTS; Chameau et al, 1994) o también mutada en la secuencia activa en cis de iniciación central cPPT (p225; Chameau et al, 1992).

30

Las secuencias de los cebadores de PCR utilizados son las siguientes:

35

Nar/Eco TRIP+: 5' gtc ggc gcc gaa ttc aca aat ggc agt att cat cc 3'
Nar TRIP-: 5' gtc ggc gcc cca aag tgg atc tct gct gtc c 3'

Las condiciones de reacción de PCR eran idénticas a las descritas anteriormente.

40 Los fragmentos de PCR de cadena triple, digeridos por NarI, se insertaron en el sitio ClaI de los plásmidos pHR GFP y pHR'CMV LacZ mediante ligamiento/digestión competitiva T4 ADN ligasa/ClaI para eliminar durante el ligamiento el vector recircularizado sobre sí mismo. La orientación de la inserción se analiza mediante digestión XhoI/EcoRI, habiéndose introducido el sitio Eco RI en el cebador PCR 5' Nar TRIP+.

45 Los plásmidos resultantes se denominan pTRIP.EGFP en la orientación correcta de la cadena triple y pTRIPinv.EGFP en la orientación inversa, no funcional. Los vectores que comprenden una versión mutada de la cadena triple se denominan pTRIP X EGFP, correspondiendo X al código del virus mutante de partida (AG, D, CTS o 225) (Chameau et al J. Mol. Biol. 1994, Chameau et al J. Virol 1992). A partir de los diferentes plásmidos pTRIP.EGFP o pTRIP X EGFP, el gen EGFP se sustituyó por Lac Z mediante intercambio orientado XhoI/BamHI.

50 Los plásmidos resultantes se denominan respectivamente pTRIP.Z, pTRIPinv.Z, pTRIP CTS.Z y pTRIP 225.Z.

Construcciones de los vectores HR luc y TRIP luc

55 El fragmento BamHI-EGFP-XhoI de los vectores RH GFP y TRIP GFP, se sustituyó por el fragmento BamHI-Luc-XhoI del plásmido pGEM-luc (Promega) que codifica luciferasa.

Producción de partículas de vectores no infecciosas

60 La producción de los vectores de VIH se realizó de acuerdo con una modificación del protocolo descrito en Naldini et al, 1996. Las partículas de vector se produjeron mediante co-transfección transitoria con fosfato de calcio de células humanas 293T (ATCC), cultivadas en medio DMEM (ICN), FCS al 10 %, penicilina, estreptomycin. Placas semi-confluentes de 175 cm² se transfectaron simultáneamente con tres plásmidos:

- 65 • 15 µg de plásmidos que codifica la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VEV), pMD.G (Naldini et al, 1996)
- 30 µg de plásmido de encapsidación, pCMVΔR8.2 (Naldini et al, 1996) o pCMVΔR8.91 (Zufferey et al, 1997).

- y 30 µg de los diferentes plásmidos vectores pHR o pTRIP.

Los co-precipitados de fosfato de calcio/ADN se dejaron en contacto con las células durante 24 horas, el medio se recogió a continuación cada 24 horas hasta el día 3 después de la transfección. Los restos celulares de los sobrenadantes de vectores se eliminaron mediante centrifugado a baja velocidad. Los sobrenadantes de vector se conservaron mediante congelación a -80 °C.

Concentración de las partículas de vector

La utilización de la envuelta VEV-G, muy estable, para pseudotipar las partículas de vector permite su concentración mediante ultracentrifugado. Los sobrenadantes de vectores, recogidos de acuerdo con el método descrito anteriormente, se ultracentrifugaron en tubos de fondo cónico (Beckman) de 30 ml, 90 minutos a 17000 rpm a +4 °C en un rotor SW 28 (Beckman). Los sedimentos se recogieron a continuación en 190 µl de PBS, se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm para retirar los restos no resuspendibles, se dividieron en alícuotas y se congelaron a -80 °C.

Transducción de células en cultivo

Las células Hela (ATCC) se transdujeron mediante adición de sobrenadantes de vector, ultracentrifugados o no, en presencia de 10 µg/ml de DEAE Dextrano. Las células Hela se cultivan en medio DMEM (ICN) suplementado con el 10 % de suero fetal de ternero (FCS). Las células HeLa se sembraron a 20.000 células/pocillo en placa de 96 pocillos, la víspera de la infección y a continuación se transdujeron en un volumen de 200 µl final. Los inóculos de vector se normalizaron de acuerdo con la concentración de proteína de la cápsida (P24), calculada de acuerdo con un ensayo ELISA comercial (DuPont). La eficacia de transferencia de gen se midió, de acuerdo con los experimentos de 24 a 48 horas después de la infección. La tasa de transducción de los vectores que expresan el gen informador LacZ era revelada mediante una tinción XGal *in situ* (Charneau et al, 1992), o mediante una reacción luminométrica de acuerdo con un kit comercial (Boehringer) siguiendo las instrucciones del proveedor. En el caso de vectores que expresan el gen informador EGFP, la tasa de transducción se evaluó cualitativamente mediante observación directa de las células vivas con el microscopio de fluorescencia, en el canal FITC. La cuantificación del número de células que expresan el marcador EGFP se realizó mediante citometría de flujo (canal FITC). La dosificación de la proteína EGFP pudo realizarse mediante medición de la fluorescencia en extracto celular. Las placas de cultivo de 96 pocillos se aclararon dos veces con PBS y a continuación se lisaron con 100 µl de PBS al 1 % NP40. La fluorescencia de EGFP se leyó gracias a la utilización de un fluorímetro en placa (modelo Victor, Wallac) con un filtro de excitación a 475 nm y un filtro de emisión a 510 nm.

Células Hela con su ciclo celular detenido en transición G1/S se repararon de acuerdo con las mismas condiciones que anteriormente con un tratamiento previo de 24 horas antes de la transducción con 4 µM de afidicolina (Sigma). En estas condiciones, más del 95 % de la incorporación de timidina tritiada se inhibía.

Transducción *ex vivo* de células primarias

Se prepararon cultivos primarios de células de médula espinal de rata de la siguiente forma: médulas de embriones de rata de 13 a 14 días se analizaron con la lupa binocular. Los tejidos se mantuvieron en medio L15 (Gibco) suplementado con 3,6 mg/ml de glucosa durante todas las etapas. Las células nerviosas se disociaron mediante incubación en tripsina (0,05 % p/v) durante 15 minutos a 37 °C. La digestión tripsina se inhibió mediante la adición del 10 % de suero fetal de ternero (FCS) y centrifugado a baja velocidad. El sedimento celular se recogió en medio L15, 3,6 mg/ml de glucosa que contenía 100 µg/ml de ADNasa I (Boehringer), mediante agitación mecánica suave. Las células se recogieron mediante centrifugado a baja velocidad a través de un filtro de BSA al 4 % (p/v).

Las células medulares se sembraron en placas de 24 pocillos que contenían láminas de vidrio de 12 mm de diámetro y recubiertas de poli-DL-Ornitina (6 µg/ml) y de laminina (3 µg/ml). Los cultivos celulares se mantuvieron en medio neurobasal (Gibco) que contenía suplemento B27, el 2 % de FCS, L-Glutamina 0,5 mM, 25 µM de beta-mercaptoetanol y 25 µM de L-Glutamato. Los cultivos se trataron después de 24 horas con 10 µg/ml de 5' fluorodesoxiuridina para prevenir la colonización del cultivo por células no neuronales.

Transducción *in vivo* de EGFP en el cerebro de rata

Los vectores que expresan la proteína marcadora EGFP se utilizaron para los experimentos *in vivo*.

Se realizaron inyecciones en el cerebro de rata con 2 µl de vector HR.EGFP o TRIP.EGFP, en ratas OFA sprague dawley de 5 semanas. En un primer momento, las ratas se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de Imagen 500 (Rhône Merieux). Las inyecciones se realizaron en el cuerpo estriado de cada hemisferio con ayuda de una guía estereotáctica, con una aguja Hamilton de 5 µl, a la velocidad de 2 µl/5 minutos. Las ratas se sacrificaron una semana o más después de la inyección, mediante perfusión con PBS y a continuación con paraformaldehído al 2 % (PFA). Los cerebros se extirparon a continuación y se cortaron para conservar solamente la parte que contenía el punto de inyección, visible mediante la lesión dejada por la aguja. Una post-fijación con PFA al 2 % se realizó

durante toda la noche, seguida de una crioprotección con sacarosa al 20 % y a continuación al 30 %. Los cerebros se recubrieron a continuación con tissue-tek[®]; se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80 °C. Se realizaron cortes seriados de 14 µm con ayuda de un criostato y a continuación se observaron con un microscopio confocal.

5 Comparación *in vitro* e *in vivo* de los vectores HR luc y TRIP luc

Las células HeLa se sembraron, un día antes de la transducción, a 20000 células por pocillo, en placas de 96 pocillos. Las transducciones se realizaron con la misma cantidad de partículas de vectores, normalizada en el contenido de p24 de las preparaciones: 1 ng de p24 por pocillo, por triplicado, en presencia de 10 µg/ml de DEAE-dextrano. Dos días después de la transducción, la actividad luciferasa se midió con ayuda de un kit Promega (siguiendo las instrucciones del fabricante) y de un aparato de medición en microplaca Wallac (Victor).

Se realizaron inyecciones de vectores, en el cuerpo estriado del cerebro de rata OFA sprague dawley y de ratón C57B. Se inyectaron 2 µl de una preparación de HR luc o TRIP luc, que contenía 25 ng de p24 (n = 4). Los animales se sacrificaron 4 días después, los cuerpos estriados se extirparon y la actividad luciferasa se midió mediante la misma técnica que anteriormente, midiendo en paralelo la cantidad de proteína total (kit Pierce).

EJEMPLOS

20 1 Aspectos fundamentales. Importación nuclear del complejo de pre-integración

VIH-1: papel de la cadena triple central

El mecanismo de transcripción inversa el virus VIH difiere del de los retrovirus oncógenos en la síntesis de la cadena-plus (cadena +) en dos mitades distintas (figura 1). Un segmento cadena abajo se inicia con una copia central del fragmento o "tracto" de polipurina (cPPT), característico de los genomas lentivirales. La síntesis de la cadena-plus cadena arriba se termina después de un desplazamiento de cadena discreto en el centro del genoma. El bloqueo del desplazamiento de cadena por la transcriptasa inversa está controlado por una nueva secuencia activa en cis del genoma de VIH: la CTS (*Central Termination Sequence*). El producto final de la transcripción inversa de los lentivirus es, por lo tanto, un ADN lineal que porta una estructura central que abarca la cadena (cadena triple central) en una centena de nucleótidos (Charneau et al, 1994). La mutagénesis dirigida de cPPT o de CTS puede abolir la iniciación o la terminación central de la síntesis de la cadena-plus. En los dos casos, los virus mutantes, cuyo ADN está desprovisto de la cadena triple central, son defectuosos para la replicación.

El análisis del defecto replicativo de los mutantes de iniciación y de terminación central mostró que el ciclo replicativo de los mutantes de iniciación o de terminación central de la transcripción inversa aborta durante una etapa posterior a la síntesis del ADN viral y posterior al direccionamiento del complejo de transcripción inversa hacia la envuelta nuclear. Cuando se analiza la estructura del ADN viral presente en las células infectadas, se percibe que los fenotipos de los mutantes de iniciación y de terminación son semejantes. En los dos casos, en efecto, la cantidad global de ADN transcrito inversamente no resulta afectada por mutaciones en la cPPT o la CTS. Se observa, por el contrario, una acumulación de ADN lineal no integrado con, al mismo tiempo, muy poco de provirus integrados o de círculos con 1 o 2 LTR formadas. Experimentos de fraccionamiento núcleos/citoplasma y de permeabilización del núcleo mostraron a continuación que estas moléculas de ADN lineal están asociadas al núcleo, pero que su integración y/o su circularización solamente pueden producirse después de la disolución de la envuelta nuclear, lo que indica claramente que el ADN viral de los mutantes es retenido en el exterior de esta envuelta. Además, los experimentos de ataque nucleásico de núcleos purificados de células infectadas por la ADNasa I inmovilizada en perlas de oro demuestran también la acumulación de ADN lineales mutantes en la cara citoplasmática de la membrana nuclear. Finalmente, una cuantificación precisa de la capacidad integradora de las moléculas de ADN lineales provistas o no de una cadena triple central nativa ha demostrado recientemente que la cadena triple central no influye en la integración del ADN lineal en una diana de ADN heterólogo *in vitro*.

El defecto replicativo de los virus mutantes para la iniciación o la terminación central de la transcripción inversa se refiere, por lo tanto, a la importación nuclear de su complejo de pre-integración y, más exactamente, a la etapa de translocación a través de los poros nucleares. Los lentivirus, y el virus VIH en particular, han desarrollado una estrategia original de transcripción inversa cuyo objetivo es crear la cadena triple en el centro de las moléculas de ADN no integradas, determinante indispensable para la entrada del genoma viral en el núcleo de una célula en interfase. Este mecanismo distingue los lentivirus de todos los demás retrovirus cuyo acceso del ADN al sitio de integración depende de la desorganización de la membrana nuclear durante la mitosis.

60 2. Generación de vectores lentivirales que contienen las secuencias activas en cis responsables de la formación de la cadena triple

2-1 Principio e interés de los vectores lentivirales

65 La generación de vectores lentivirales eficaces supone el conocimiento de los determinantes responsables de la importación nuclear activa y, por lo tanto, de la infección de células no mitóticas.

El descubrimiento de la implicación de la cadena triple en la importación nuclear del genoma de VIH-1 tiene consecuencias importantes para la construcción de vectores lentivirales eficaces. Éste supone la conservación, en la construcción de vector, de las secuencias activas en cis y responsables de la formación de la cadena triple de ADN durante la transcripción inversa lentiviral. La aplicación en vectorología de este trabajo fundamental consiste en añadir en las construcciones de vectores lentivirales, la región central cPPT-CTS para crear la estructura de ADN triple durante la transcripción inversa del genoma del vector. Debe observarse que numerosas tentativas de construcción de vectores lentivirales, basadas en el mismo principio que los vectores derivados de los oncovirus (en general del VLMMo), se han mostrado muy decepcionantes, al menos en términos de valor cuantitativo infeccioso. Estos vectores son vectores de sustitución, es decir que el conjunto del genoma retroviral se deleciona y a continuación se sustituye, entre las dos LTR y la secuencia de encapsidación, por el gen informador o el gen de interés terapéutico (Miller et al, 89). De acuerdo con los inventores, este tipo de construcción no es óptima en el caso de vectores lentivirales debido a la necesidad de la región central cPPT-CTS para la importación nuclear del ADN viral. Sin embargo, vectores de VIH construidos en base al mismo principio que los vectores retrovirales derivados de oncovirus, pero pseudotipados mediante la envuelta muy fusión de la estomatitis vesicular (VEV-G) y concentrados mediante ultracentrifugado, permiten la transducción *in vivo* de neuronas de rata (Naldini et al, 1997; Blomer et al, 1997), de hígado y de músculo diferenciado (Kafri et al, 1997). No obstante, experimentos de complementación de xenoinjertos de epitelio pulmonar humano con estos vectores de VIH que codifican el gen CFTR (fibrosis quística) se han mostrado muy decepcionantes. La parte esencial del ADN del vector en este tejido permanecería en forma de ADN lineal no integrado, revelando de este modo un defecto probable de importación nuclear (Goldman et al, 1997; véase el capítulo "influencia de la cadena triple central sobre la tasa de importación nuclear del ADN del vector").

2.2. Construcción y producción de los vectores VIH "con cadena triple"

Para ensayar la importancia de la estructura triple en un sistema vector, los inventores tomaron como base las construcciones descritas por Naldini et al. En este sistema (figura 2), las partículas de vector VIH son producidas por co-transfección transitoria de tres plásmidos: un plásmido de encapsidación que expresa el conjunto de las proteínas virales a excepción de la envuelta del VIH, un plásmido que expresa la envuelta de VEV-G y un plásmido vector, pHR-CMV LacZ, que comprende las LTR de VIH, la señal bipartita de encapsidación de VIH y una casete de expresión de LacZ. En un primer momento, el gen informador LacZ se sustituyó por un gen que codifica una versión muy fluorescente de la EGFP (*E Green Fluorescent Protein*) [Proteína Verde Fluorescente Mejorada], más práctica para los estudios de transducción *in vivo*. La región central del genoma de VIH-1 LAI que comprende las secuencias activas en cis cPPT y CTS, responsables de la formación de la cadena triple, se amplificó por PCR y a continuación se insertó en el sitio ClaI, en la construcción del vector pHR-EGFP. La inserción de una cadena triple silvestre en la orientación correcta genera el vector pTRIP-EGFP; en la orientación inversa (no funcional), el vector pTRIPinv-EGFP.

2.3. Ensayo rápido y sensible de detección de virus auxiliar "helper" en las preparaciones de vectores lentivirales:

40 Ausencia de virus infeccioso auxiliar "helper" en los "sobrenadantes de vector"

La producción de partículas de vector a partir de tres plásmidos independientes y que poseen un mínimo de secuencias homólogas permite minimizar la probabilidad de generar un virus auxiliar "helper" competente para la replicación. Además, la construcción de encapsidación se delecionó para la envuelta del VIH y para el conjunto de los genes llamados accesorios para la replicación (Vif, Vpr, Vpu, Nef). El genoma del vector encapsidado ya no contenía más VIH que las 2 LTR, las secuencias necesarias para la encapsidación y la secuencia triple. Sin embargo, cada linaje vectorial se ensayó en busca de la presencia de virus auxiliar "helper" infeccioso. Células MT4 se infectaron por triplicado, en microplaca, durante una noche, y a continuación se lavaron exhaustivamente y se volvieron a cultivar durante 5 días para amplificar el inóculo. A continuación, se infectaron células indicadoras P4 (HeLa CD4 LTR-LacZ) con las células MT4 y su sobrenadante durante 3 días para detectar las partículas infecciosas producidas. Finalmente, se realizó una tinción X-gal *in situ*. De esta forma, cualquier partícula infecciosa producida es detectable en forma de un sincitio azul. Este protocolo sensible permite detectar un inóculo de VIH de 0,25 pg de P24, o aproximadamente 3200 partículas físicas. Sabiendo que, en el caso del VIH, se estima que una sola partícula de 1000, o incluso de 10.000, es infecciosa, el protocolo debía permitir probablemente detectar una partícula infecciosa única.

Los sobrenadantes de vector están sistemáticamente desprovistos de partículas infecciosas de VIH.

60 2.4. Efecto de la cadena triple sobre la eficacia de transducción por los vectores *in vitro*

En un primer momento (figura 3), se midió el efecto de la inserción de la cadena triple central sobre la transducción de células HeLa. Se infectaron células HeLa con un sobrenadante de transfección de vector la cadena triple central silvestre (TRIP GFP), un vector sin esta secuencia (HR GFP), o con una secuencia triple mutante (TRIP GFP D). El mutante D es un mutante de cPPT que impide la iniciación central de la cadena+ y, por lo tanto, la formación de la cadena triple central (figura 3). Las infecciones se realizaron con sobrenadantes que contenían la misma cantidad de partículas normalizada respecto a la cantidad de proteína de la cápsida p24.

La transducción de la GFP en las células Hela aumentó en presencia de una cadena triple silvestre y se llevaba a una tasa basal en presencia de una cadena triple no funcional.

5 Este aumento de valoración puede cuantificarse gracias a la utilización del gen informador LacZ (figura 4). Estas células se transdujeron por triplicado normalizando en referencia a la cantidad de proteína p24. Las transducciones se realizaron respecto a células bloqueadas o no en división con afidicolina, que bloquea las células en G1/S. Los vectores utilizados eran, HRZ (sin cadena triple), TRIP Z (con cadena triple), TRIP Z inv (la secuencia triple está orientada en sentido inverso, no es funcional y no conduce a la formación de una cadena triple central).

10 Figura 4A: El aumento de transducción de la β gal mediante vectores que contienen la cadena triple es de 6 a 10 veces. Éste se pierde cuando la cadena triple no se ha formado (TRIP Z inv).

15 Figura 4B: El efecto de la cadena triple sobre la transducción de β gal es independiente de la división celular: se obtienen resultados similares en células en división o bloqueadas con afidicolina.

Por otro lado, se obtienen los mismos resultados en células HeLa, ya esté el plásmido de encapsidación utilizado durante la producción de las partículas de vector delecionado o no en los genes accesorios Vif, Vpr, Vpu, Nef.

20 2.5. Efecto de la cadena triple sobre la eficacia de transducción por los vectores ex vivo

El impacto de la cadena triple sobre la transducción de la EGFP en células primarias no mitóticas se midió a continuación. Se transdujeron explantes primarios de médula espinal de rata enriquecidos en neuronas, con sobrenadantes de vector ultracentrifugados. Las transducciones se realizaron con menos de 10 μ l de vector ultracentrifugado, que contenía el mismo número de partículas, normalizado con respecto al número de ng de proteína de la cápsida p24.

Figura 6: el vector que posee una secuencia triple transduce un número mucho más grande de células de explantes primarios de médula espinal de rata que el vector sin cadena triple.

30 2.6. Impacto de la cadena triple sobre la transducción in vivo en el cerebro

El efecto de la cadena triple sobre la transducción de la EGFP *in vivo* se midió a continuación mediante inyección directa en el cerebro de rata. El mismo volumen (2 μ l) de sobrenadante de vector con o sin cadena triple que contenía la misma cantidad de proteína p24 se inyectó en el cuerpo estriado. Mientras que se detectaron un gran número de células transducidas en las ratas inyectadas con el vector con cadena triple (figura 7a), fue posible detectar pocas células que expresaban EGFP en el cerebro de las ratas inyectadas con el vector sin cadena triple, y esto mismo en el punto exacto de la inyección, visible por la lesión dejada por la aguja.

40 En la figura 7b, la construcción de vectores VIH (con o sin secuencia de ADN triple) que expresan el gen informador luciferasa (HR Luc y TRIP.Luc) permitió cuantificar de forma precisa el impacto sobre la transducción de genes en el cerebro. In vitro, un aumento de un factor 8 se observa en las células HeLa (figura 7-b1). Un beneficio análogo se obtiene después de la inyección directa in vivo en el cuerpo estriado de cerebro de rata (figura 7-b2) o de ratón (figura 7-b3).

45 2.7. Impacto de la cadena triple sobre la importación nuclear del genoma del vector

Un ensayo que permite seguir a lo largo del tiempo el conjunto de las formas de ADN del vector en la célula transducida fue desarrollado por los inventores: ADN lineal, círculos con 1 o 2 LTR pero también provirus integrado. Este ensayo se basa en la detección mediante Southern del ADN viral de acuerdo con una estrategia de corte y de elección de sonda que permite diferenciar las diferentes formas de ADN retroviral (véase la figura 8). El ADN total de las células infectadas o de las células transducidas por los vectores es digerido por una o dos enzimas de restricción para liberar un fragmento interno, común a todas las formas de ADN retroviral o de ADN del vector presentes en las células (ADN lineal no integrado, ADN circular con una o dos LTR y provirus integrado). En el caso del vector, las enzimas seleccionadas son Eco NI y Ava II. Utilizando como sonda un fragmento generado por PCR que abarca exactamente el sitio Eco NI, aparecen varias bandas correspondientes a las diferentes formas de ADN. El fragmento interno permitirá calcular después de la cuantificación en Phosphorimager el ADN total vector presente en las células. Un fragmento de 1,16 Kb corresponde al fragmento distal del ADN lineal no integrado, otro de 3,3 Kb corresponde a los círculos no integrados. Después de la cuantificación de las señales con un phosphorimager, la tasa de importación nuclear viene indicada por el porcentaje de ADN viral integrado y en forma circular (ADN virales nucleares) con respecto al ADN lineal citoplasmático. Las primeras transferencias preliminares mostraron un perfil de ADN intracelular característico de un defecto de importación nuclear en el caso de los vectores desprovistos de cadena triple o cuya región central del genoma VIH-1 se ha insertado de forma inversa. En efecto, la intensidad de la señal correspondiente al ADN lineal era equivalente a la de la señal de ADN total, 48 horas después de la infección. En otras palabras, el procesamiento del ADN del vector está mayoritariamente bloqueado en la fase lineal no integrada, muy pocas moléculas se integran (figura 9). Por el contrario, en el caso de los vectores que poseen una cadena triple, solamente queda poco ADN lineal a las 48 horas, lo que indica que su mayor parte ha sido importada

al núcleo de la célula transducida, y a continuación se ha integrado.

2.8. Estudio del efecto de la posición de la cadena triple de ADN en la construcción del vector

5 Se encuentran en todos los lentivirus las secuencias activas en cis cPPT y CTS, responsables de la formación de la cadena triple durante la transcripción inversa. En todos los casos, esta cadena triple se encuentra a varios nucleótidos cerca del centro del genoma ADN lineal. Esta posición central de la cadena triple podría ser importante para el funcionamiento óptimo de este determinante de la translocación a través del poro nuclear. Las construcciones del vector realizadas, la secuencia triple se ha insertado justo cadena arriba de la unidad transcripcional del gen informador. De acuerdo con el tamaño del gen informador, esta cadena triple se encontraría más o menos cerca del centro del genoma ADN lineal del vector. En el caso del gen informador de EGFP (0,7 Kb), la cadena triple está muy próxima al centro de la construcción; mientras que en el caso de LacZ (3,1 Kb), está más alejada de éste (figura 2). En los dos casos, la presencia de la cadena triple indujo un aumento de valor cuantitativo importante de los sobrenadantes vectores. Existe por lo tanto cierta "flexibilidad" en la posición de la cadena triple en el genoma del vector. Sin embargo, los vectores que codifican la EGFP se han mostrado claramente más eficaces que los que codifican LacZ. Es posible, por lo tanto, que una cadena triple colocada idealmente permita un aumento de valor cuantitativo suplementario. Para poner a prueba esta hipótesis, los inventores decidieron clonar, en lugar de los genes informadores, un banco de fragmentos de tamaño aleatorio (digestión parcial Sau3A), analizándose la distribución en tamaño de los fragmentos clonados antes y después de la transducción de células diana. En el caso donde la posición central de la cadena triple fuera importante para su función, la limitación de construcción de un vector simétrico con respecto a la cadena triple sería importante. Es posible evitar este obstáculo insertando la unidad transcripcional del vector en la región U3. Después de la transcripción inversa, el transgén se duplicará a uno y otro lado de la cadena triple antes de integrarse, respetando de este modo una posición exactamente central de la cadena triple.

25

2.9. Transferencia in vivo en diferentes tejidos diferenciados

Se estudia la capacidad de los vectores lentivirales "de cadena triple" para transducir eficazmente y de forma estable los tejidos diferenciados afectados en diversas patologías genéticas. El potencial de estos vectores en el cerebro, y en diferentes tejidos tales como el músculo, el epitelio pulmonar y el hígado en rata o en ratón. Pueden obtenerse respuestas cualitativas de forma relativamente rápida gracias a la utilización del gen informador de EGFP. Se permiten mediciones cuantitativas del impacto de la cadena triple sobre la tasa de transducción de estos tejidos utilizando el gen informador de luciferasa. Por otro lado, la capacidad de estos vectores para transducir las células madre totipotentes del tejido hematopoyético humano puede evaluarse, a partir de células CD34+ purificadas o a partir de células de sangre de cordón total.

30

35

2.10. Transferencia de genes con alta eficacia a células madre hematopoyéticas mediante los vectores de VIH con cadena triple.

40 Las células madre hematopoyéticas son dianas de importancia fundamental para el tratamiento de un gran número de trastornos genéticos vinculados a la sangre, musculares o neurológicos y de enfermedades infecciosas. La dificultad principal para la transferencia de gen mediante vectores retrovirales derivados de oncovirus como el VLMo en estas células, es que éstas se dividen muy poco y que la inducción de mitosis por un tratamiento con citoquina viene acompañada en general por una pérdida de su totipotencia. En la figura 16, los resultados de la transducción del gen de GFP en las células madre CD34 por el vector TRIP-GFP muestran una expresión de la GFP en más del 85 % de las células. La eficacia de transducción de las células madre CD34 por el vector sin cadena triple HR-GFP es muy inferior (Miyishi H et al., Science 1999, 283, p 682-6). Al estar las células madre CD34 transducidas desde su purificación, su capacidad clonogénica permanece intacta.

45

2.11. Utilización de los vectores lentivirales con secuencia triple para la transducción de células embrionarias; Aplicación en la construcción de animales transgénicos o de líneas celulares modificadas.

Los vectores retrovirales son potencialmente herramientas interesantes para la construcción de animales transgénicos mediante la transducción de huevos (Rubenstein et al., 1986, PNAS, 83, p 366-368) o de células ES (Friedrich y Soriano, 1991, Genes Dev. 5, p 1513-1523). La utilización de los vectores lentivirales es susceptible de aumentar la eficacia de transducción de estas células totipotentes. Nuestros resultados preliminares de transducción de células embrionarias de ratón por el vector TRIP-GFP muestran una gran eficacia de transferencia del gen de GFP, pero también una extinción completa de la transcripción del transgén de GFP. Se sospecha que algunas secuencias virales en particular el *primer binding site* [sitio de unión del cebador] (PBS) intervienen en esta extinción de expresión. Para evitar este obstáculo, se construyeron vectores autodelecionantes para estas secuencias virales, basados en el sistema de recombinación específica CRE/Lox (Choulika et al., 1996, J. VIROL, 70, p 1792-98).

60

2.12. Composición inmunógena con aplicaciones profilácticas y/o terapéuticas:

65 Una nueva estrategia de inmunización: vectores lentivirales con cadena triple.

Introducción

El papel de los linfocitos T citotóxicos en la respuesta antitumoral y antiviral se ha documentado en numerosos sistemas experimentales murinos, pero también en el ser humano. Diferentes estrategias de vacunación pretenden inducir una respuesta citotóxica protectora contra los tumores o agentes infecciosos. Los vectores lentivirales tienen la capacidad de atravesar los poros nucleares y son, por consiguiente, mucho mejores vectores de transducción de células. La transducción de las células *in vitro* y/o *in vivo* puede conducir a la presentación por estas células, de los epítomos de antígenos tumorales y/o virales que a continuación inducirán una inmunidad celular específica. Por estas razones, los inventores estudiaron la capacidad inmunogénica de los vectores lentivirales con cadena triple recombinantes utilizando las células dendríticas transducidas *in vitro* o la administración directa *in vivo* en ratones humanizados mediante la expresión de HLA-A2.1 (Pascalo S. y col. 1997). Este ratón HHD "HLA-A2.1 puro" es el mejor modelo animal para el estudio de la respuesta citotóxica HLA-A2.1 restringida y se ha propuesto para realizar estudios preclínicos de inmunoterapia. El conjunto de nuestros resultados muestra claramente la capacidad inmunogénica de los vectores lentivirales con cadena triple que contienen los epítomos tumorales y, debido a esto, los vectores lentivirales con cadena triple representan una nueva estrategia de inmunoterapia.

Estudio inicial: comparación de diferentes estrategias de vacunación

Utilizando los ratones HHD, se compararon previamente diferentes estrategias de vacunación. Seleccionado arbitrariamente 5 epítomos tumorales, los inventores compararon cinco estrategias de inmunización aplicables en clínica humana: (i) péptidos sintéticos en adyuvante incompleto de Freund, (ii) lipopéptidos, (iii) partículas recombinantes Ty de levadura donde, de manera independiente, los epítomos se fusionaron en C-terminal a la proteína Pl. (iv) administración intramuscular de ADN-desnudo que codifica la glucoproteína del virus de la hepatitis B fusionado a los epítomos en su parte pre-S2, (v) inyección intravenosa de células dendríticas cargadas de péptidos después de la expansión y diferenciación *in vitro* a partir de las células de la médula. Habiendo observado que las inyecciones de estructuras particulares (Ty recombinantes de levadura) o de ADN desnudo recombinante que codifica una glucoproteína S del virus de la hepatitis B (Referencia WO 95/11307 publicada el 25/04/95) eran las estrategias más eficaces de inducción de respuestas citotóxicas, los inventores documentaron, por inserción en esta glucoproteína de un motivo poliepitópico derivado del melanoma (10 epítomos distintos), la posibilidad de inducir simultáneamente en todos los ratones ensayados respuestas citotóxicas contra 5 péptidos epitópicos de 10.

Los antígenos particulares Ty o de ADN desnudo se han mostrado eficaces estrategias de inducción de las respuestas citotóxicas. Sin embargo, la producción a una gran escala de partículas Ty es difícil. Además, se teme que la introducción de epítomos hidrófobos y múltiples en el segmento pre-S2 de la glucoproteína del virus de la hepatitis B no conlleva una fuerte reducción de la producción de partículas por las células CHO (modo de preparación de la actual vacuna contra la hepatitis). Los vectores lentivirales (VIH-1) recombinantes producidos en forma de pseudotipos ampliamente deletionados, pero que hayan conservado la secuencia de ADN triple, tienen la capacidad de atravesar la membrana nuclear de células que no se dividen y representan una estrategia de vacunación nueva y potencialmente más eficaz con respecto a las estrategias de vacunación mencionadas anteriormente.

Materiales, métodos y resultados

Ratones transgénicos

Los ratones HHD, expresan una construcción monocatenaria donde los dominios de presentación peptídica (a1, a2) de la molécula HLA-A2.1 están asociados covalentemente en el extremo N, a la β 2-microglobulina humana. El dominio a3 y la parte intracitoplasmática de la molécula HLA-A2.1 se sustituyen por su equivalente de la molécula H2Db (Pascolo S. y col. 1997). Estos ratones permiten estudiar la inmunogenicidad de péptidos epitópicos y de diferentes estrategias de vacunación de forma comparativa.

Construcción del vector TRIP-MEL IRES GFP

Un vector bi-cistrónico TRIP-IRES-GFP se construyó en primer lugar. El sitio EcoRI del vector TRIP-IRES-GFP se llenó con la ADN polimerasa T4 creando el vector TRIP-DeltaE-GFP. A continuación, un fragmento de aproximadamente 1,2 kb BamHI-BstXI-SnaBI-EcoRI-IRES-EGFP-XhoI se clonó en lugar del fragmento BamHI-EGFP-XhoI. El fragmento que contiene el IRES-EGFP (*Internal Ribosome Entry Site*) [Sitio Interno de Entrada al Ribosoma] es una donación por gentileza del Dr. Yongwon Choi (Rockefeller University, N.Y., Estados Unidos). Un fragmento que contiene una secuencia consenso Kozac y un poliepitopo CTL de melanoma se generó mediante PCR, en la matriz pBS mel poly con pfu polimerasa y los oligonucleótidos: 5BgIIIu Mel: 5' cc agatct acgcgt gcc acc atg gct ggt 3' 3RIMel: 5' CG GAATTC GAC CTA AAC GCA ACG GAT G 3'. El fragmento de PCR mel se digirió a continuación por BgIII y EcoRI y se clonó en los sitios BamHI y EcoRI del vector TRIP-DeltaE-IRES-GFP, creando el vector TRIP-MEL-IRES-GFP.

65

Eficacia de transducción in vitro de células dendríticas (CD) por los vectores lentivirales GFP con o sin cadena triple

5 Las CD murinas se obtuvieron a partir de la médula de ratones transgénicos HHD en presencia de IL4 y GM-CSF. Las CD humanas se obtuvieron a partir donantes sanos de haplotipo HLA-A2.1 (véase a continuación). Estas células se transdujeron con los vectores LV, con o sin cadena triple, utilizando concentraciones diferentes (75, 150 y 300 ng-p24 de vectores lentivirales para 5×10^5 células).

10 La expresión de GFP en las CD se midió mediante FACS los días 2, 5 y 10. Los valores en términos de intensidad media de fluorescencia correspondientes a la eficacia de transducción de las células mostraron que los vectores lentivirales con cadena triple tienen una capacidad de transducción de 5 a 7 veces más elevada de las CD humanas con respecto a los vectores lentivirales sin cadena triple.

Inducción de las respuestas CTL primarias utilizando células dendríticas humanas transducidas por el vector TRIP-MEL-IRES-GFP

20 Las CD humanas inmaduras se obtuvieron a partir de donantes sanos de haplotipo HLA-A2.1 en presencia de GM-CSF e IL13 (1DM, París, Francia). El inmunofenotipado de estas células mediante los anticuerpos monoclonales contra CD1, CD4, HLA-ABC, HLA-DR, CD80 y CD86 demostró su carácter inmaduro con una pureza de CD superior al 91 %.

25 Las CD obtenidas de este modo se transdujeron con el vector TRIP-MEL-IRES-GFP a la concentración de 100 ng p24/vector para 1×10^6 células. La eficacia de transducción de las CD con TRIP-MEL-IRES-GFP se estudió midiendo la expresión de GFP mediante FACS. Las células mononucleares (CMN) procedentes del mismo donante se estimularon con las CD transducidas previamente. Después de tres estimulaciones, la actividad citotóxica de estas células se ensayó en células T2 cargadas individualmente con 4 péptidos epitópicos utilizando un ensayo CTL convencional de 4 horas. Los péptidos epitópicos Mage-3, gp100.154, GnTV/NA17/A, y Tyrosinase368-D se seleccionaron debido a su inmunogenicidad elevada en los experimentos anteriores.

30 Se observaron respuestas citotóxicas específicas contra todos los epítomos ensayados. El porcentaje de lisis observado para cada epítomo se representa en la figura 12.

Inmunización directa de ratones HHD por el vector TRIP-MEL-IRES-GFP

35 Los ratones HHD se inmunizaron con 2,5 μ p24 del vector TRIP-MEL-IRES-GFP por ratón por vía subcutánea (SC), intravenosa (IV) e intraperitoneal (IP). El día 11 de inmunización, las células esplénicas de cada ratón se inmunizaron individualmente con los péptidos epitópicos de melanoma durante 6 días de los cuales 2 días en presencia del 10 % de TCGF. La actividad lítica de estas células se ensayó a continuación en células RMA5 cargadas con los péptidos correspondientes o en células HeLa-HHD transducidas con el vector TRIP-MEL-IRES-GFP.

45 Los resultados obtenidos para cada uno de los ratones se representan en términos de lisis específica en células RMA5 (Tabla 1) y en células HeLa-HHD transducidas (Tabla 2). Los mejores resultados se obtuvieron después de la administración del vector por vías SC e IP a la vez en términos de lisis y de número de respuestas inducidas simultáneamente en un ratón dado. El hecho notable es que la mayoría de los ratones inmunizados por vía IP desarrollan respuestas citolíticas contra todos los péptidos epitópicos (figura 13).

Tabla 1: Respuesta citotóxica específica después de inmunización con el vector TRIP-MEL-IRIS GRP Células diana: RIMAS cargadas con los péptidos correspondientes.

Proporción Efectores/diana = 30

Lisis específicas obtenidas después de inmunización de ratones HHD con LV que contiene un polipéptido de melanoma. Estimulación in vitro para cada ratón individual SC el día 8 en presencia de TCGF y de péptido

	Ratón	gp154	gp209	gp280	gp457	G-nTV	Image-3	Mart1.27	Mart1.32	Tyro-1	Tyro368-D
S.C.	1	25	4	13	8	54	17	17	4	4	10
	2	44	1	5	11	89	10	11	4	3	6
	3	39	0	19	21	81	29	26	6	4	0
I.V.											
	1	7	7	1	8	25	5	8	3	4	3
	2	10	8	0	13	70	13	16	5	9	14
	3	24	6	5	5	65	15	16	3	11	10
I.P.	4	5	3	13	12	14	10	5	0	3	0
	1	30	10	2	3	57	9	6	4	3	2
	2	63	8	7	17	72	11	19	9	7	7
	3	21	7	8	16	72	14	32	0	7	7

**Tabla 2: Respuesta citotóxica específica después de inmunización con el vector TRIP-MEL-IRES GRP
Células diana: HeLa-HHD transducidas con el vector TRIP-MEL-IRES-GFP. Proporción Efectores/diana = 30
Respuestas citolíticas de los ratones HHD inmunizados S.C, I.V. o I.P. con el vector TRIP-MEL-IRES-
GFP. Los resultados obtenidos en células HeLa-HHD que expresan el poliepitopo de melanoma.**

	gp154	gp209	gp280	gp457	G-nTV	Mage-3	Mart1.27	Mart1.32	Tyro-1	Tyro368
S.C.	2	18	15	24	62	15	20	12	20	18
I.V.	8	10	15	23	50	14	29	10	10	18
I.P.	24	18	15	25	62	15	32	14	18	20

Conclusión

5 Los resultados demuestran la capacidad de los vectores lentivirales con cadena triple de inducir respuestas inmunitarias muy eficaces. Su poder inmunogénico se ha demostrado no solamente *in vitro* en células dendríticas humanas sino también se ha evaluado en el modelo de ratón transgénico HLA-A2.1 de acuerdo con diferentes modos de administración. De forma notable, se obtuvieron respuestas CTL específicas para los diez epítopos CTL
10 contenidos en el poliepitopo de melanoma. Los porcentajes de lisis contra los antígenos de melanoma son también más elevados que los obtenidos en los mismos ratones HHD con otras estrategias de vacunación como los lipopéptidos, vacuna recombinante o la vacunación de ADN con las pseudo-partículas de VHB. Por consiguiente, las estrategias de vacunación, basadas en los vectores lentivirales con cadena triple son aplicables a diversas patologías variadas tumorales o infecciosas.

4- BIBLIOGRAFÍA

- 20 Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol.* 1997 Sep; 71(9): 6641-6649.
- Charneau P, F. Clavel. 1991. A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *J. Virol.*, vol. 65, Nº 5, 2415-2421.
- 25 Chameau P., Alizon M. y Clavel F. (1992). A second origin of plus strand synthesis is required for optimal HIV replication. *J. Virol.* 66: 2814-2820.
- Chameau P.G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc, F. Clavel. 1994. HIV-1 reverse transcription: a termination step at the center of the genome. *J.Mol.Biol.*, vol. 241, 651-662.
- 30 Goldman MJ, Lee PS, Yang JS, Wilson JM. Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther.* 10 de diciembre de 1997; 8(18): 2261-2268.
- Heyman T., Agoutin B., Friant S., Wilhelm F.X., Wilhelm ML., 1995, Plus-Strand DNA Synthesis of the Yeast Retrotransposon Ty1 is Initiated at Two Sites, PPT1 Next to the 3' LTR and PPT2 Within the p01 Gene. PPT1 is sufficient for Ty1 Transposition. *J. Mol. Biol.*, vol. 253, 291-303.
- 35 Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet.* Noviembre de 1997; 17(3): 314-317.
- 40 Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos.* 15 de octubre de 1996; 93(21): 11382-11388.
- 45 Naldini L. Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono O. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 12 de abril de 1996; 272(5259): 263-267.
- Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfert and expression. *BioTechniques* (1989), Vol 7, p 980-990.
- 50 Pascolo S., N. Bervas, J.M. Ure, A.G. Smith, F.A. Lemonnier y B. Pérarnau. 1997. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8+ T lymphocytes from β 2 microglobulin (β 2m) HLA-A2.1 monochain transgenic, H-2Db, β 2m double knockout mice. *J. Exp. Med.* 185, 2043-2051.
- 55 Poeschia F.M., Wong Staal F., Looney D.J. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vector - *Nature Medicine*, vol. 4, nº 3: 354-357.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* Septiembre de 1997; 15(9): 871-875.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR

5 <120> UTILIZACIÓN DE SECUENCIAS DE LENTIVIRUS DE ESTRUCTURA TRIPLE PARA LA IMPORTACIÓN NUCLEAR DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

<130> B03920AAB AD/LV/CAL

10 <150> FR9805197
<151> 24-04-1998

<160> 39

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 14
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

25 <400> 1
aacaagggga ggga 14

<210> 2
<211> 24
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

35 <400> 2
aaaaaat tttt gttttacaa aatc 24

<210> 3
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <223> oligonucleótido

<400> 3
cgggatcccc accggtcgcc acc 23

50 <210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 4
60 ccctcgagct agagtcgagg ccg 23

<210> 5
<211> 38
<212> ADN
65 <213> Artificial

<220>

ES 2 607 484 T3

<223> oligonucleótido

<400> 5
 5 gtcgtcggcg ccgaattcac aaatggcagt atcatcc 38

<210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 6
 15 gtcgtcggcg ccccaaagtg gatctctgct gtcc 34

<210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 7
 25 ccagatctac gcgtgccacc atggctgctg gt 32

<210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 8
 35 cggaattcga cctaaacgca acggatg 27

<210> 9
 <211> 200
 <212> ADN
 40 <213> Virus de la encefalitis-artritis caprina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(200)
 <223> Polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS

<400> 9
 50

gttccagcca caatttgcg ctgtagaatc agccatagca gcagccctag tcgccataaa 60

tataaaaaga aagggtgggc tggggacaag ccctatggat atttttatat ataataaaga 120

acagaaaaga ataaataata aatataataa aaattctcaa aaaattcaat tctgttatta 180

cagaataagg aaaagaggac 200

<210> 10
 <211> 200
 <212> ADN
 55 <213> Virus de anemia infecciosa equina

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(200)
 <223> Polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS

<400> 10

5

cttgaacaa agggagggaa agtatgggag gacagacacc atgggaagta tttatcacta 60
atcaagcaca agtaatacat gagaaacttt tactacagca agcacaatcc tccaaaaaat 120
tttgttttta caaaatccct ggtgaacatg attggaaggg acctactagg gtgctgtgga 180
agggatgatgg tgcagtagta 200

<210> 11
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Virus visna

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(200)
 <223> Polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS

15

<400> 11

ggaccctcat tactctaaat ataaaaagaa aggggtgggct agggacaagc cctatggata 60
tatttatatt taataaggaa caacaaagaa tacagcaaca aagtaaatca aaacaagaaa 120
aaattcgatt ttgttattac agaacaagaa aaagagggca tccaggagag tggcaaggac 180
caacacaggt actttggggc 200

20

<210> 12
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia simia

25

<220>
 <221> misc_Feature
 <222> (1)..(200)
 <223> Polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS

30

<400> 12

tactgatggc ttgcatactt cacaatttta aaagaaaggg aggaataggg ggacagactt 60
cagcagagag actaattaat ataataacaa cacaattaga aatacaacat ttacaaacca 120
aaattcaaaa aattttaaat tttagagtct actacagaga agggagagac cctgtgtgga 180
aaggaccggc acaattaatc 200

35

<210> 13
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(200)
 <223> Polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS

45

<400> 13

tgcatgaatt ttaaagaag ggggggaata ggggatatga ctccatcaga aagattaatc 60
aatatgatca ccacagaaca agagatacaa ttctccaag ccaaaaattc aaaattaata 120
gattttcggg tctatttcag agaaggcaga gatcagttgt ggaaaggacc tggggaacta 180
ctgtggaaag gagaaggagc 200

5 <210> 14
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(200)
 <223> Polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS

 <400> 14

cagtattcat ccacaatttt aaaagaaaag gggggattgg ggggtacagt gcaggggaaa 60
gaatagtaga cataatagca acagacatac aaactaaaga attacaaaaa caaattacaa 120
aaattcaaaa ttttcgggtt tattacaggg acagcagaga tccactttgg aaaggaccag 180
caaagctcct ctggaaaggt 200

15 <210> 15
 <211> 119
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(119)
 <223> Polinucleótido que comprende las regiones cPPT y CTS

 25 <400> 15

ttttaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 60
agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttc 119

30 <210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 35 <400> 16
 aaaagaaaag ggggg 15

 40 <210> 17
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 45 <400> 17
 aaaacaaggg gggg 14

 50 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia simia

	<400> 18 aaaagaaaag ggggg	15
5	<210> 19 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de la inmunodeficiencia simia	
10	<400> 19 aaaagaaaag ggagg	15
15	<210> 20 <211> 22 <212> ADN <213> visna virus	
20	<400> 20 aaaaaagaaa aagaaagggt gg	22
25	<210> 21 <211> 22 <212> ADN <213> caprine arthritis-encephalitis virus	
30	<400> 21 aaaaataaaa aaagaaagggt tg	22
35	<210> 22 <211> 13 <212> ADN <213> Equine infectious anemia virus	
40	<400> 22 aacaaggggg gaa	13
45	<210> 23 <211> 14 <212> ADN <213> Virus de la inmunodeficiencia humana	
50	<400> 23 aaaagaaggg gggg	14
55	<210> 24 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de la inmunodeficiencia simia	
60	<400> 24 aaaagaaggg gagga	15
65	<210> 25 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de la inmunodeficiencia simia	
	<400> 25 aaaagaaagg gagga	15 página 5
60	<210> 26 <211> 22 <212> ADN <213> Virus visna	
65	<400> 26 aaatataaaa aagaaagggt gg	22

5 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Virus de la encefalitis-artritis caprina

<400> 27
 aaatataaaa aaagaaaggg tg 22

10 <210> 28
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Virus de anemia infecciosa equina

15 <400> 28
 aaagggaggg aaa 13

20 <210> 29
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> péptido
 <400> 29

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
 1 5

30 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> péptido
 <400> 30

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
 1 5

45 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> péptido
 <400> 31

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
 1 5

55 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> péptido

<400> 32

Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg Leu
1 5 10

5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> péptido

15

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

20

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> péptido
<400> 34

Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu
1 5

30

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> péptido
<400> 35

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu
1 5

40

45

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

50

<220>
<223> péptido
<400> 36

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5

55

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido

5 <400> 37

Val Leu Pro Asp Val Phe Ile Arg Cys
1 5

10 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido

<400> 38

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

20 <210> 39
<211> 92
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> péptido

<400> 39

30

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala
1 5 10 15

Leu Val Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Leu Leu Asp Gly Thr
20 25 30

Ala Thr Leu Arg Leu Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val Tyr Met
35 40 45

Asp Gly Thr Met Ser Gln Val Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
50 55 60

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly
65 70 75 80

Val Leu Val Leu Pro Asp Val Phe Ile Arg Cys Val
85 90

REIVINDICACIONES

1. Uso o de un polinucleótido para la fabricación de un vector plásmido recombinante destinado a la producción, mediante cotransfección de plásmidos de transcomplementación, de partículas lentivirales recombinantes desprovistas de genes lentivirales y destinadas a la transducción a células eucariotas diana de una secuencia de nucleótidos de interés, partículas donde dicho polinucleótido es el determinante de importación nuclear, estando dicho polinucleótido derivado de un lentivirus y constituido por una región activa en cis de iniciación central (cPPT) que contiene al menos 10 nucleótidos, de una región activa en cis de terminación (CTS) que contiene al menos 10 nucleótidos, y una concatenación interna de nucleótidos flanqueada por dos regiones, constituyendo dicha región CTS y dicha concatenación interna de nucleótidos una secuencia que tiene un tamaño de 80 a 120 nucleótidos, siendo capaz dicho nucleótido de formar una estructura de triplete durante la retrotranscripción del genoma de dichas partículas en la célula eucariota diana, estando dicho plásmido desprovisto de genes lentivirales y que comprende una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende
- dicha secuencia de nucleótidos de interés puesta bajo el control de señales reguladoras de la transcripción y de la expresión,
 - señales reguladoras de retrotranscripción, de expresión y de encapsulación derivadas de un lentivirus y
 - dicho polinucleótido, cuyas regiones activas en cis citadas están insertadas en una orientación funcional con dichas señales reguladoras derivadas de un lentivirus.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el plásmido vector recombinante está destinado a trascomplementación mediante la introducción de secuencias codificantes de los polipéptidos GAG, POL y ENV, o por una parte de estos polipéptidos suficiente para permitir la formación de particular retrovirales.
3. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el polinucleótido se ha derivado del virus VIH, VEAC, EIAV, VISNA, SIV o FIV.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el polinucleótido está derivado del genoma de un lentivirus VIH-1 o VIH-2.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el polinucleótido es un fragmento procedente del genoma del VIH-1.
6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** la secuencia de nucleótidos de interés es un gen, una parte de un gen, una secuencia derivada de un gen, o una secuencia de sentido contrario.

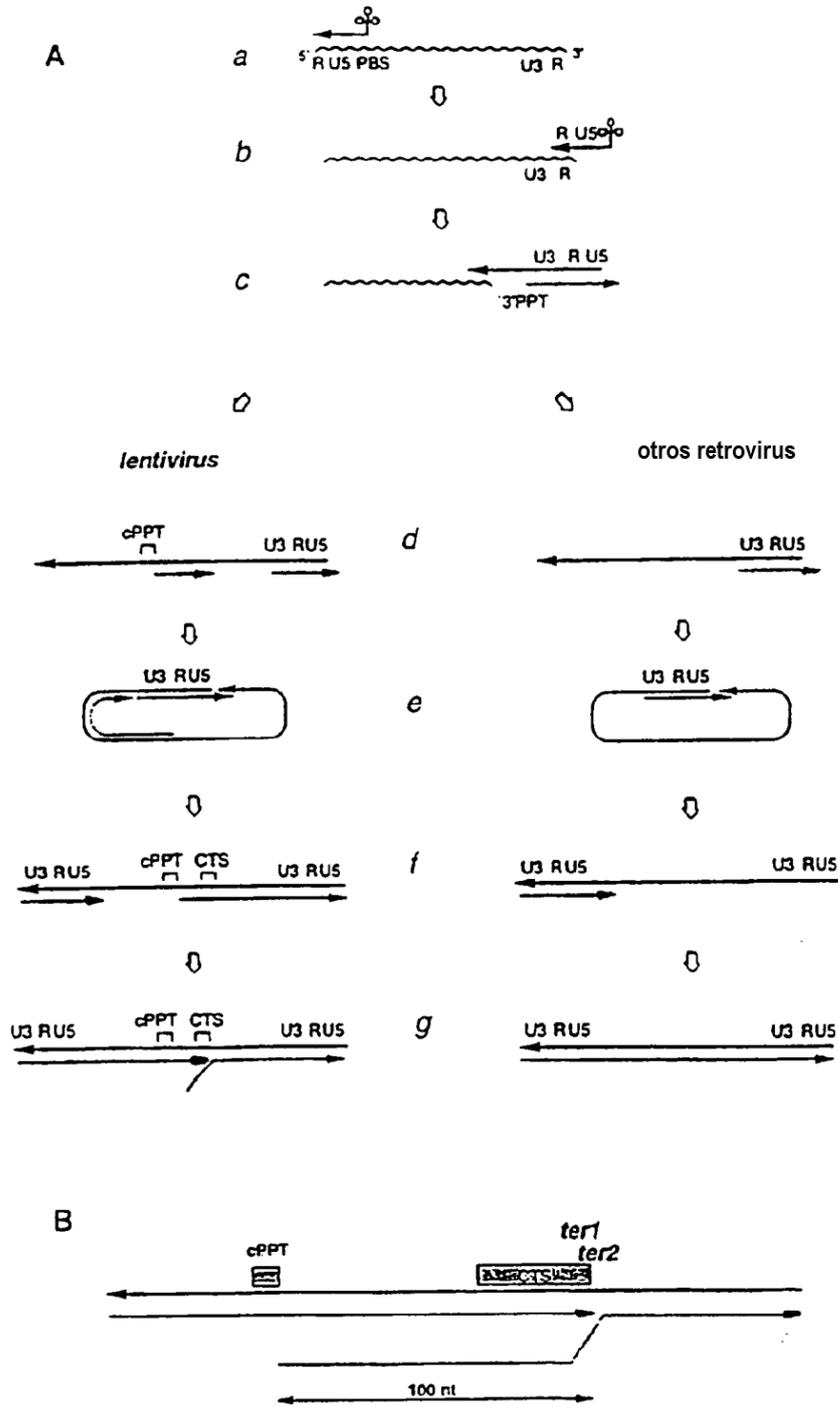


Figura 1: Transcripción inversa de lentivirus, formación de la cadena triple de ADN central

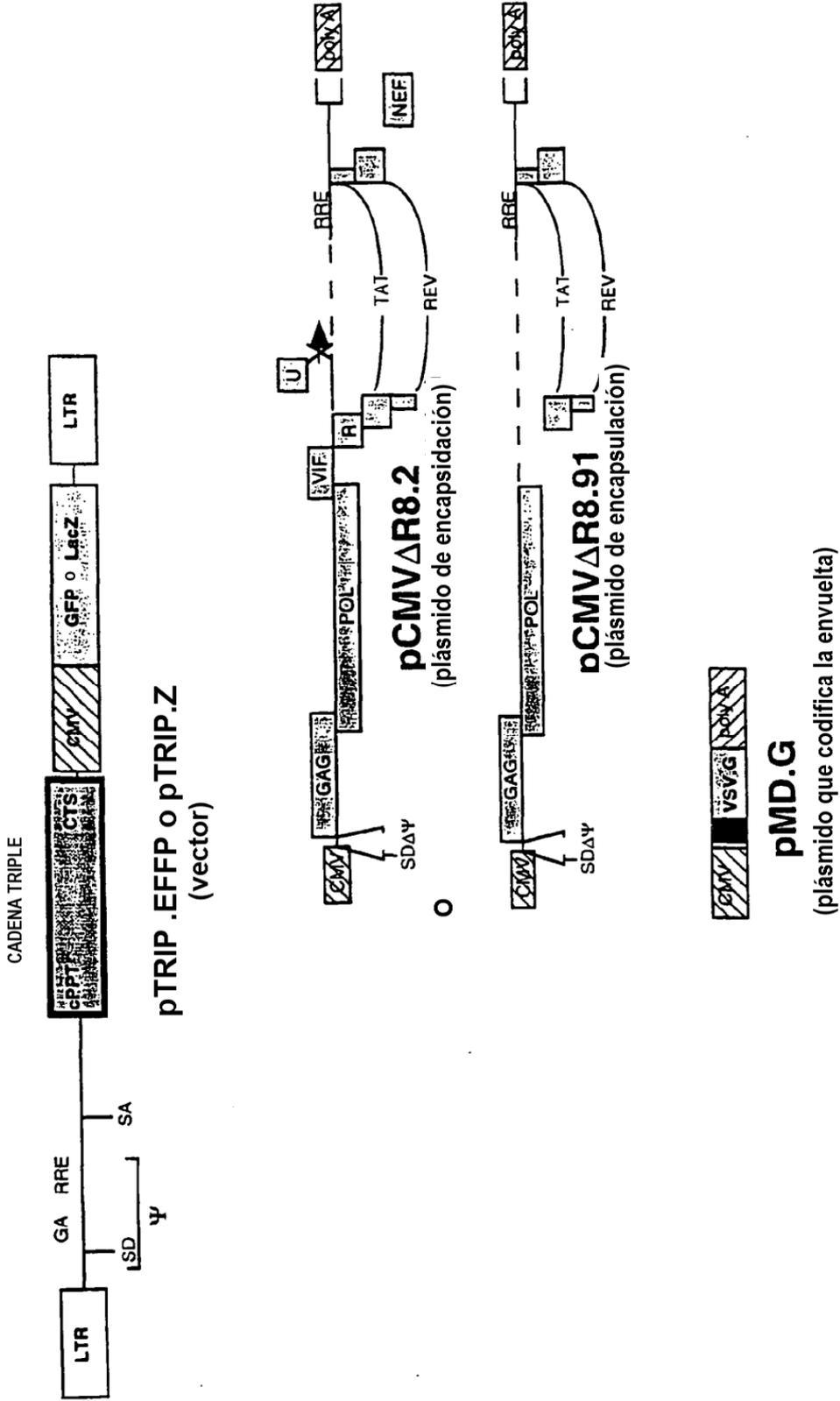


Figura 2: Plásmidos utilizados para la producción de partículas del vector VIH

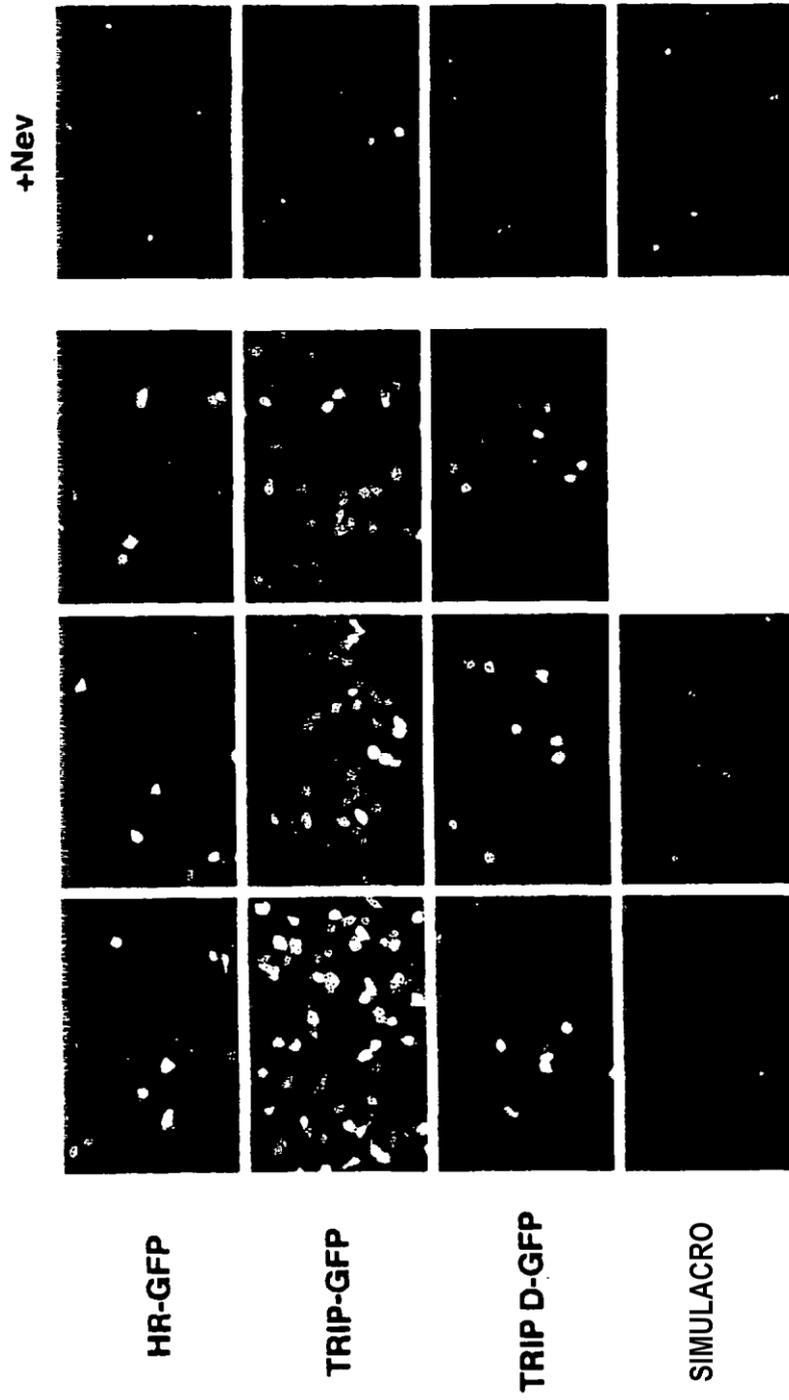


Figura 3: Impacto de la cadena triple sobre la transducción de EGFP en células HELA

Figura 4: Cuantificación de la tasa de transducción del gen de EGFP por los vectores del VIH con o sin cadena triple

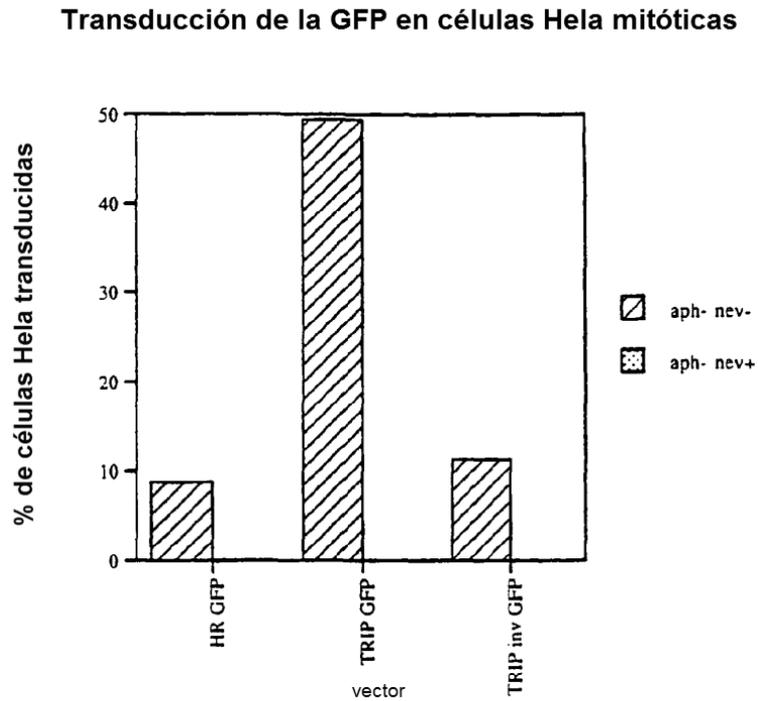


Figura 4A

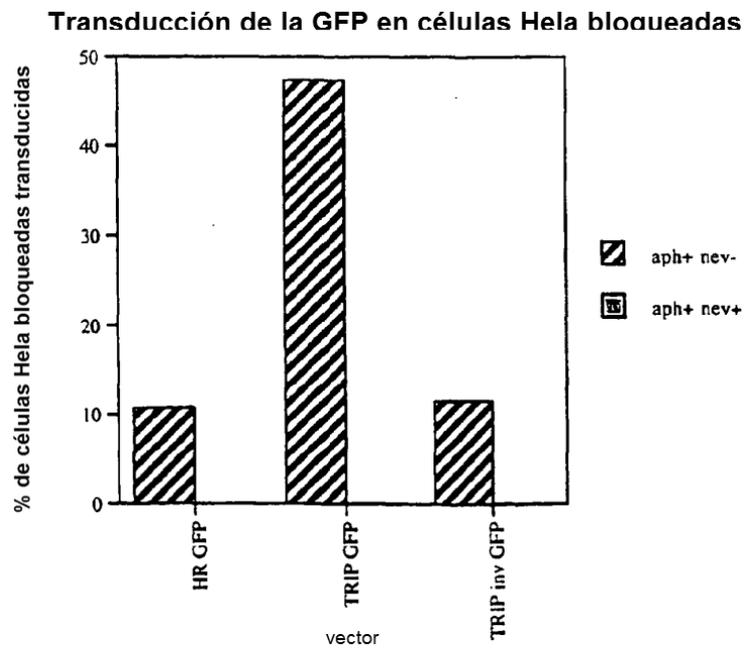


Figura 4B

Impacto de la cadena triple sobre la transducción de células HeLa en división o en ausencia de división con GFP

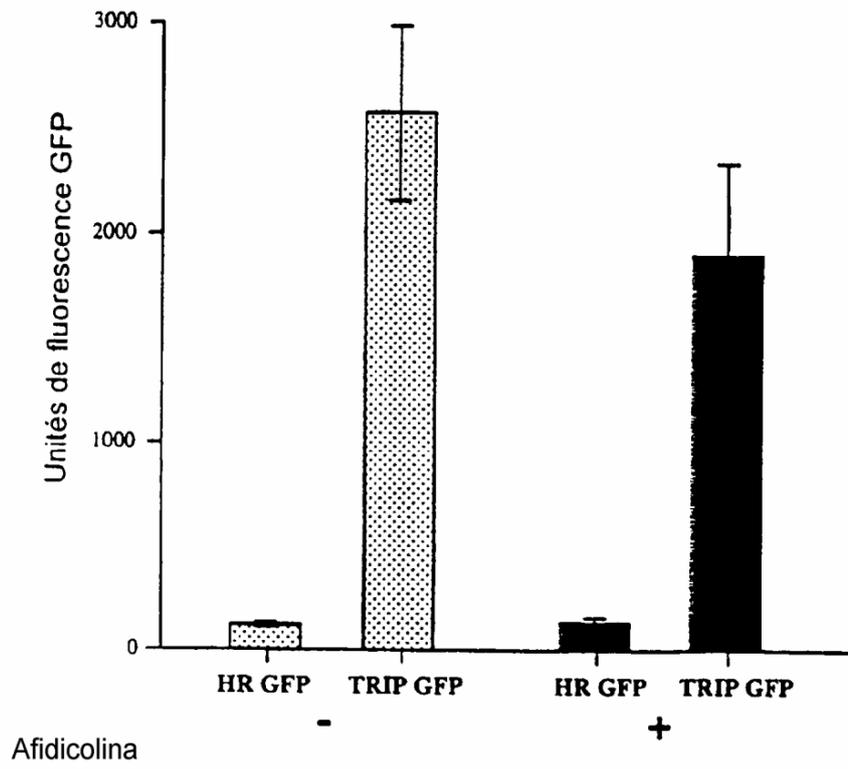


Figura 4C

Figura 5: Cuantificación de la tasa de transducción del gen LacZ por los vectores de VIH con o sin cadena triple

Figura 5A: Transducción de β gal en células HeLa mitóticas

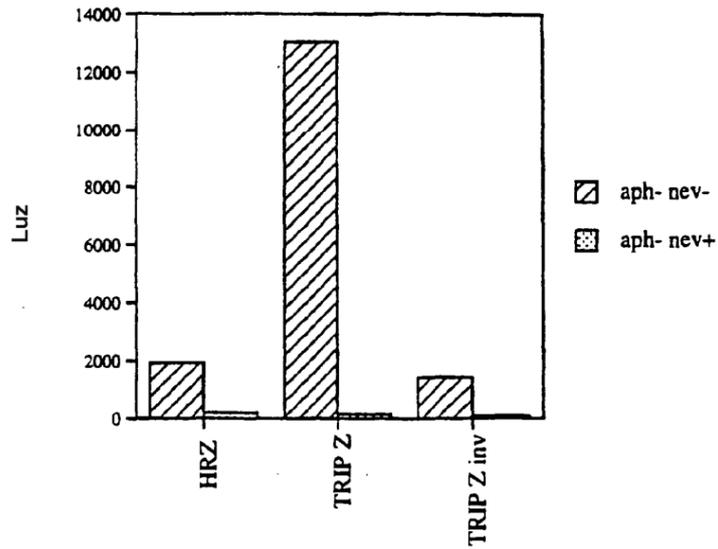
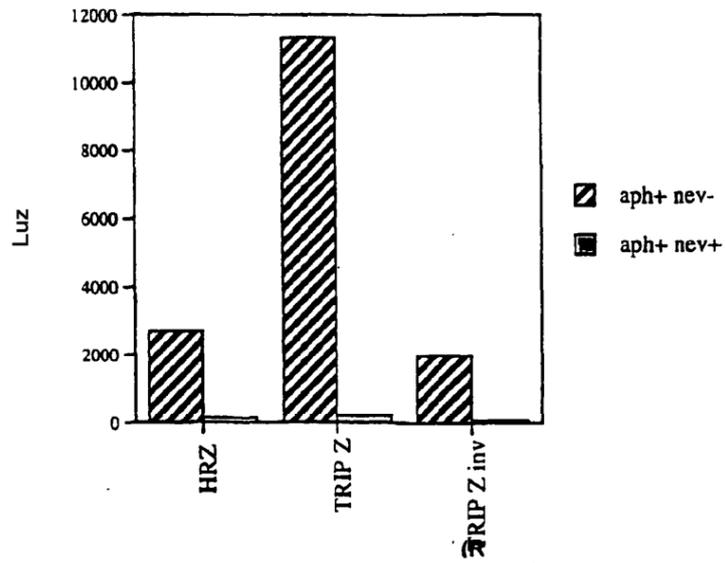


Figura 5B: Transducción de β gal en células HeLa no mitóticas



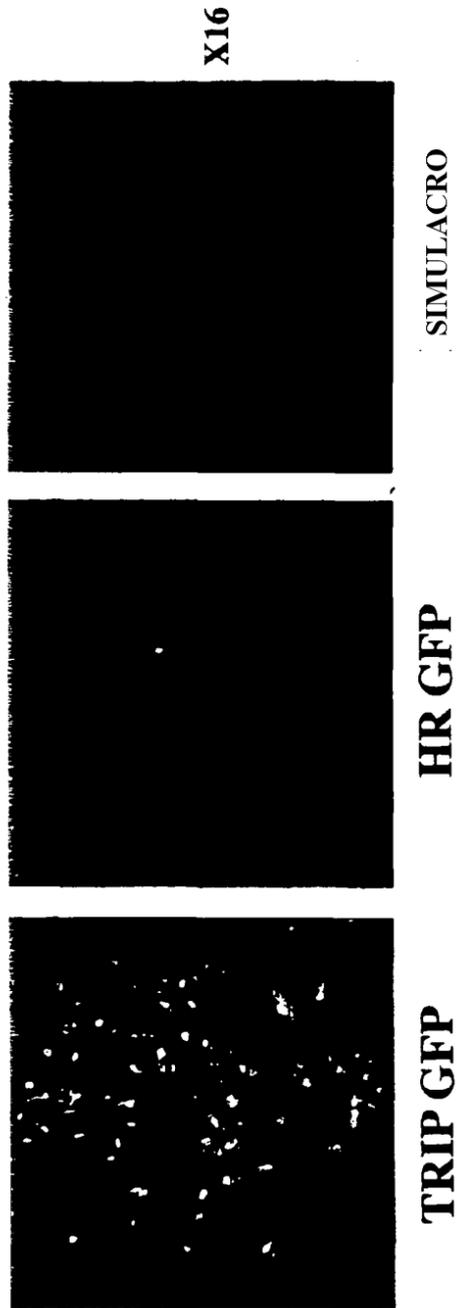


FIGURA 6A: IMPACTO DE LA CADENA TRIPLE CENTRAL SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DEL GEN DE GFP EN CÉLULAS MEDULARES PRIMARIAS DE RATA

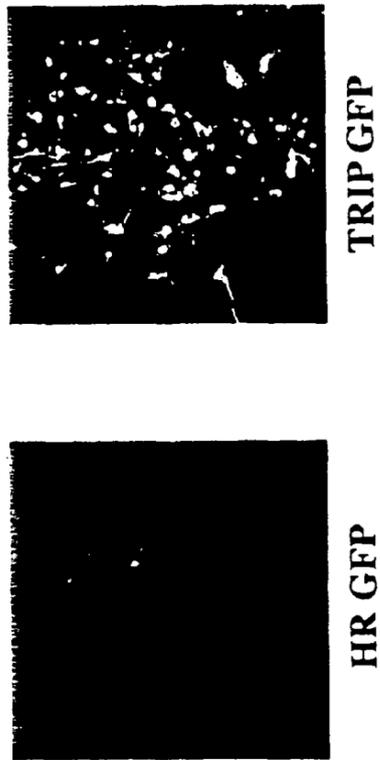
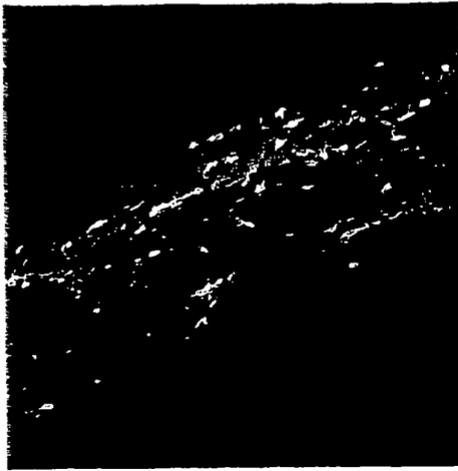


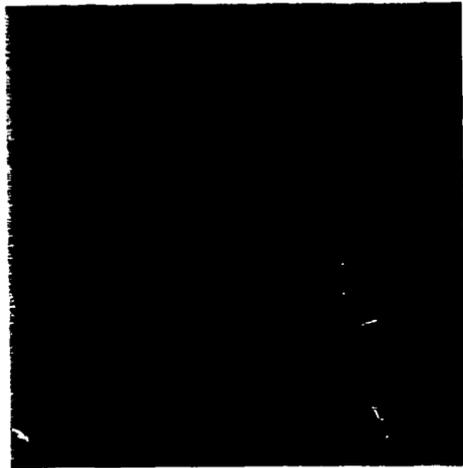
FIGURA 6B: IMPACTO DE LA CADENA TRIPLE CENTRAL SOBRE LA TRANSDUCCIÓN DEL GEN DE GFP EN CÉLULAS MEDULARES PRIMARIAS DE RATA



FIGURA 7A1: IMPACTO DE LA CADENA TRIPLE SOBRE LA TRANSDUCCIÓN IN VIVO DEL GEN DE EGFP EN EL CEREBRO DE RATA TRANSDUCCIÓN A NIVEL DEL SITIO DE INFECCIÓN



TRIP GFP



HR GFP

A

B

FIGURA 7A2: IMPACTO DE LA CADENA TRIPLE SOBRE LA TRANSDUCCIÓN IN VIVO DEL GEN DE GFP EN EL CEREBRO DE RATA

Impacto de la cadena triple sobre la transducción de la actividad luciferasa en células HeLa in vitro

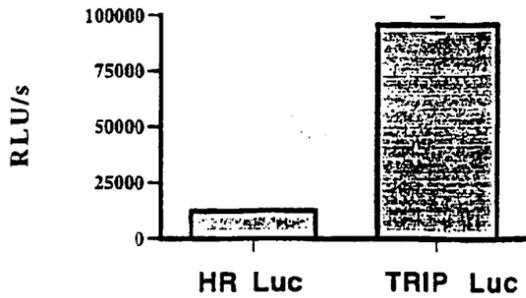


Figura 7b1

Impacto de la cadena triple sobre la transducción de la actividad luciferasa en cerebro de rata in vitro

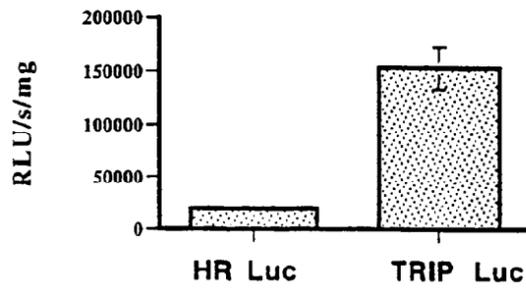


Figura 7b2

Impacto de la cadena triple sobre la transducción de la actividad luciferasa en cerebro de ratón in vitro

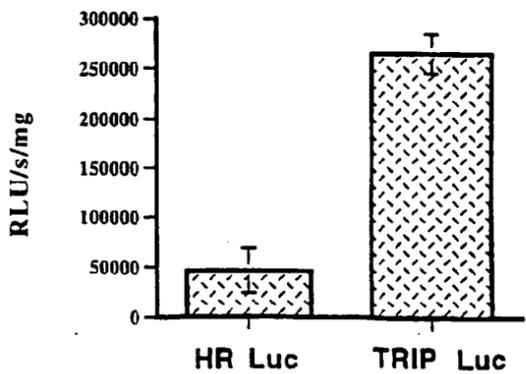


Figura 7b3

Método para el análisis cuantitativo de la maduración del ADN del vector

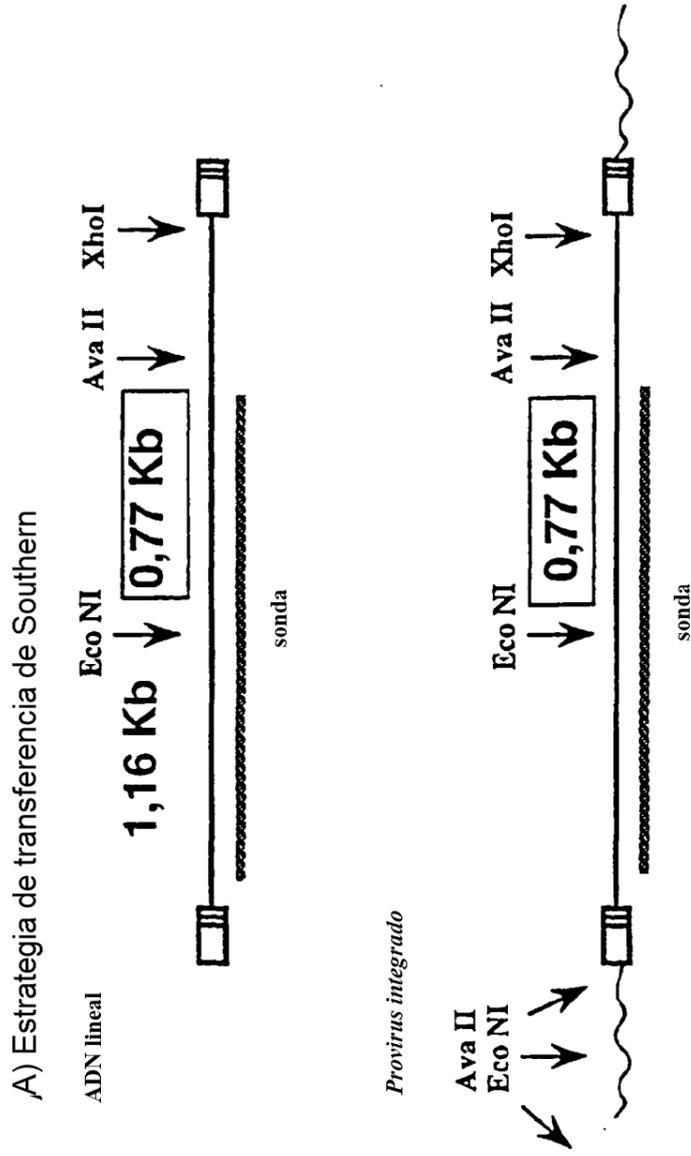


FIGURA 8A

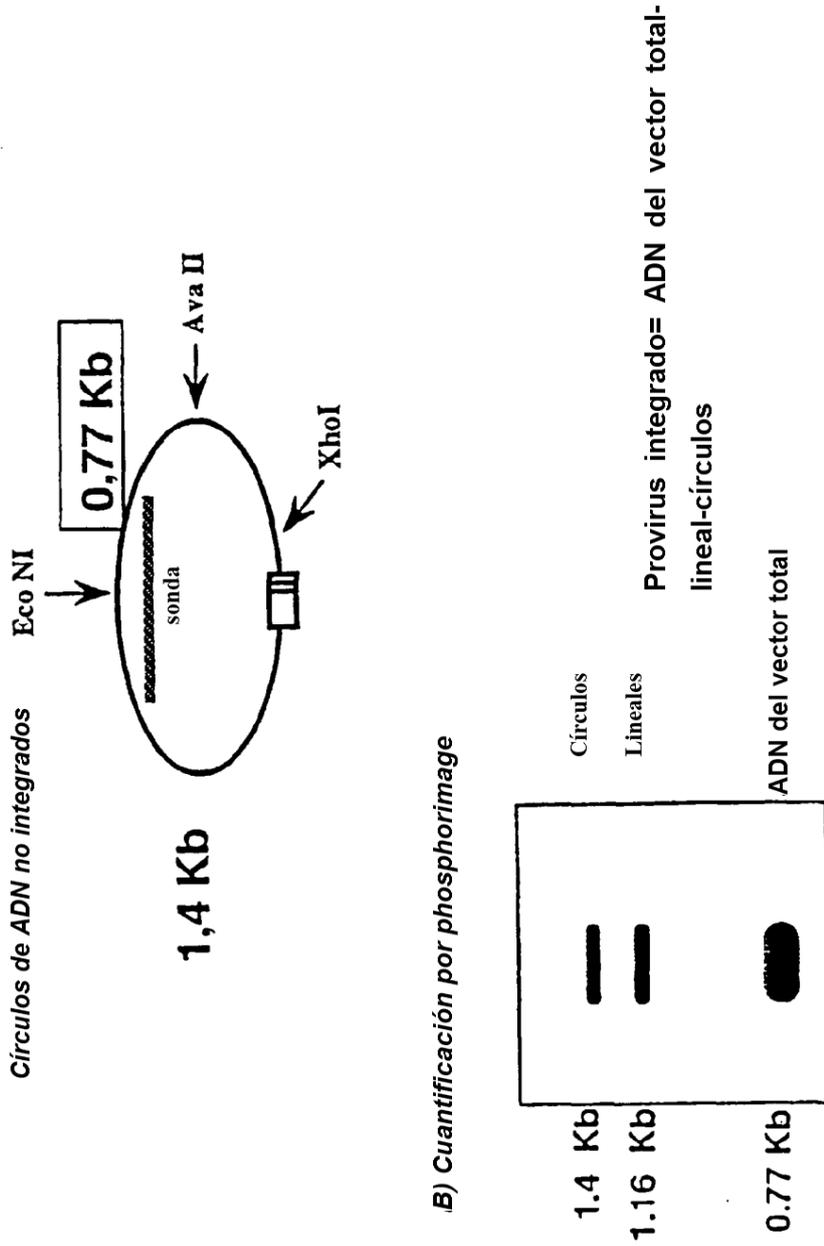


Figura 8B



FIGURA 9A: Análisis de la tasa de importación nuclear de los ADN del vector

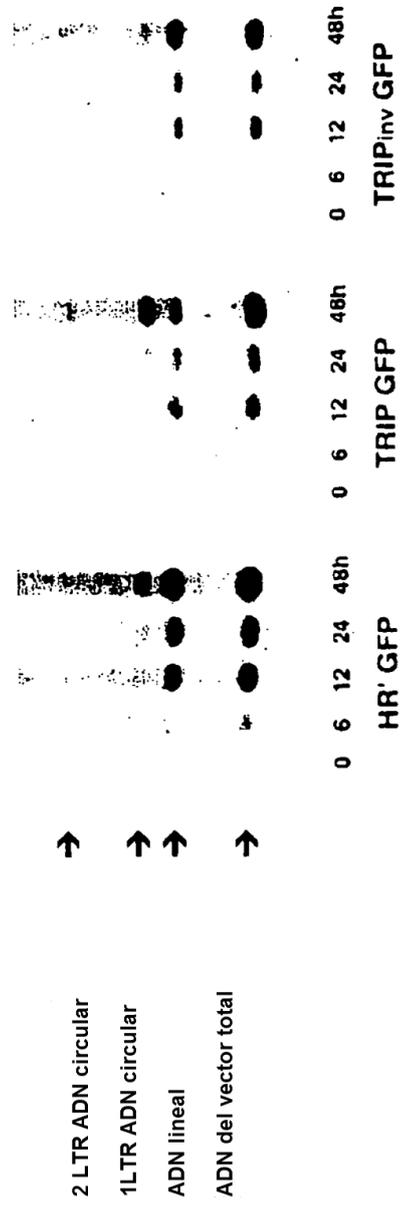


Figura 9B

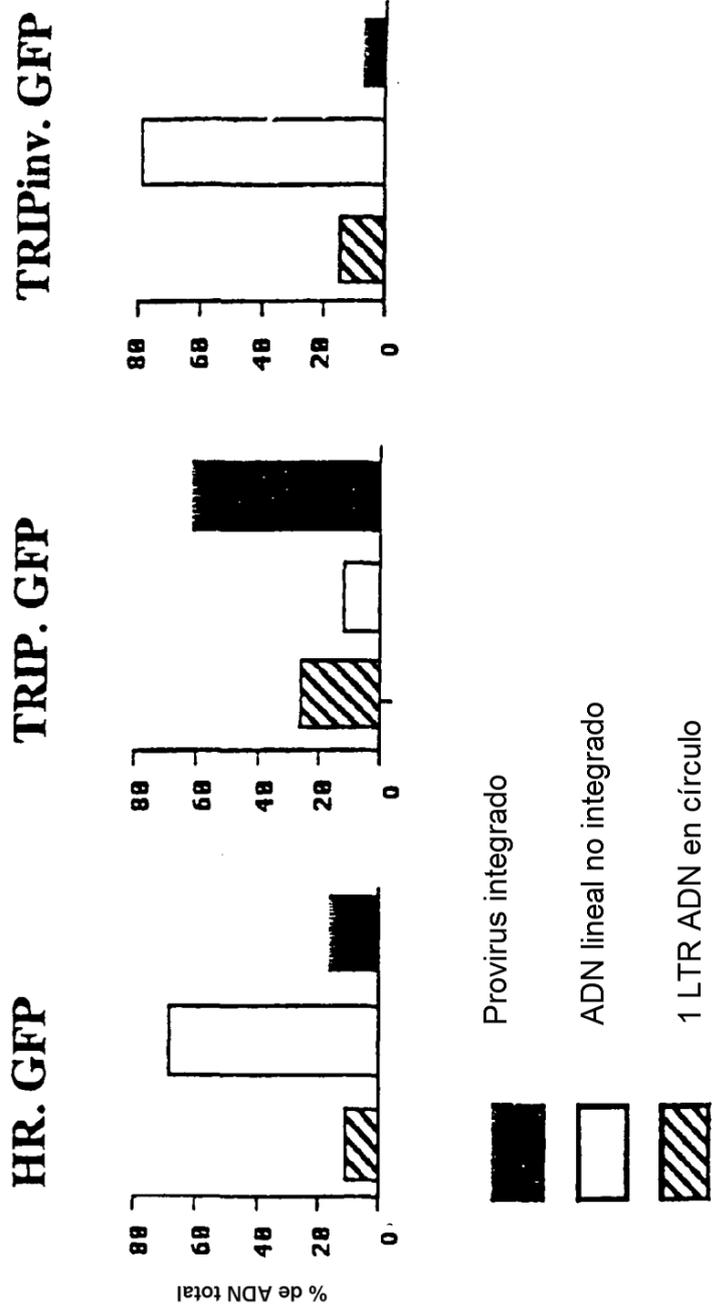


FIGURA 9C

VECTOR DE VIH CON CADENA TRIPLE: TRIP-EGFP

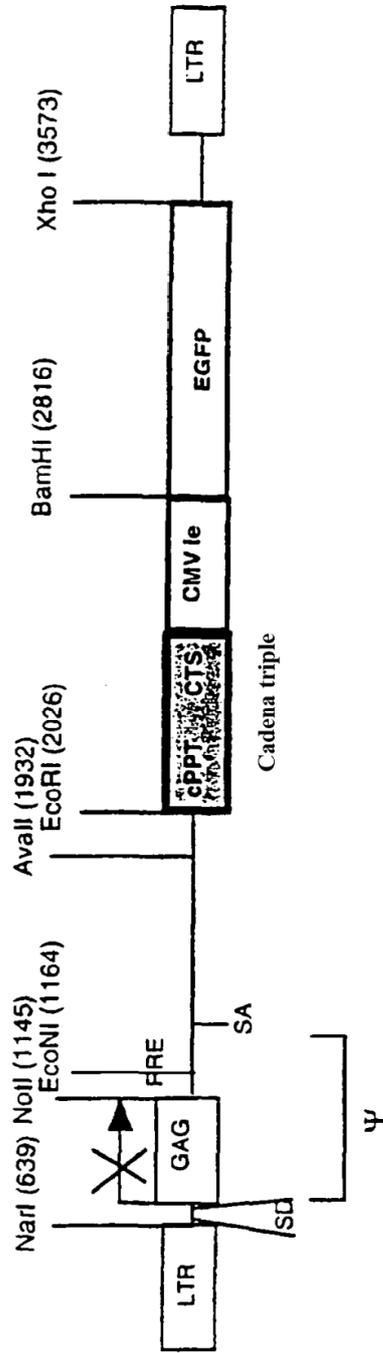


Figura 10

CADENA TRIPLE DE VAIE (virus de anemia infecciosa equina)

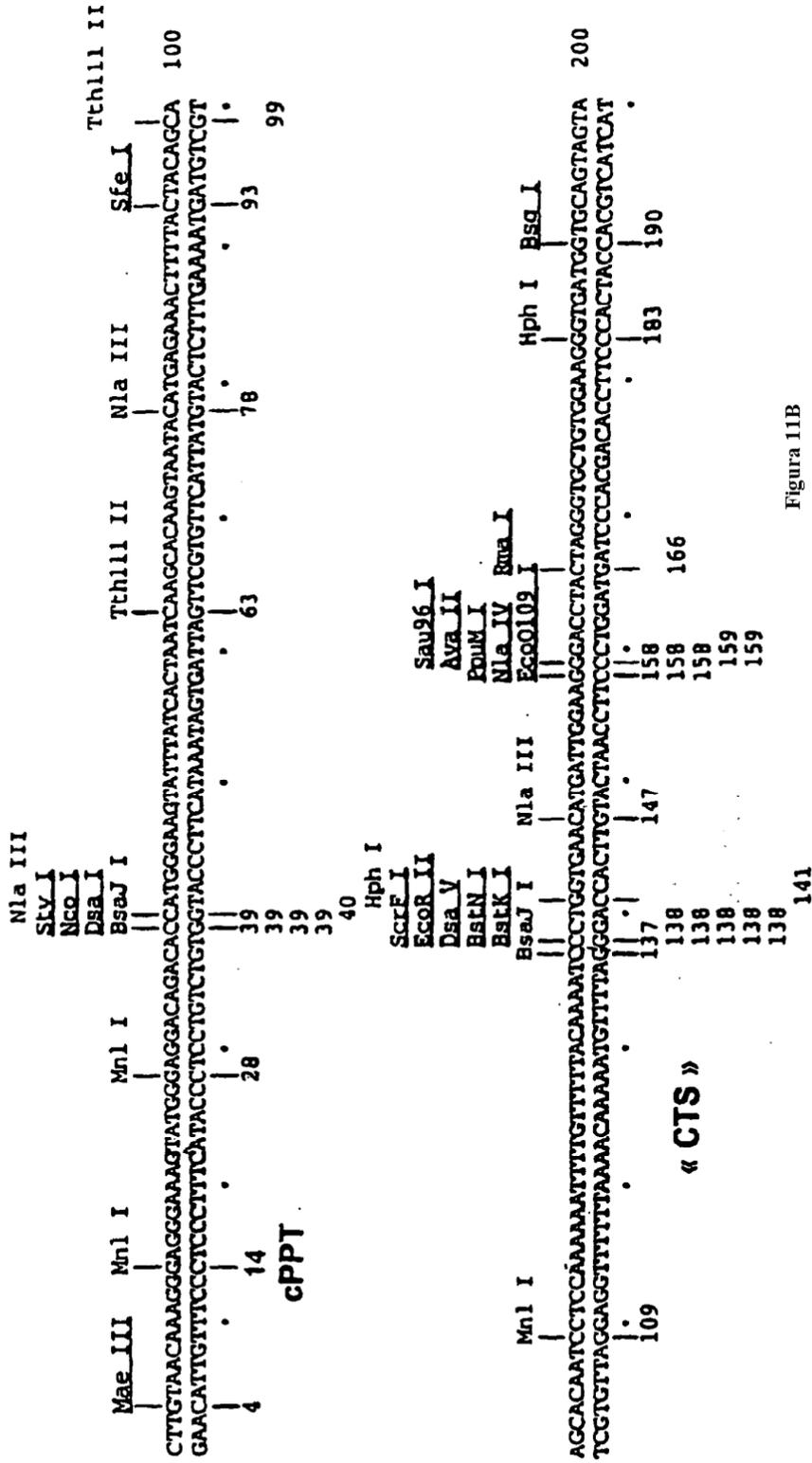


Figura 11B

CADENA TRIPLE DE VISNA

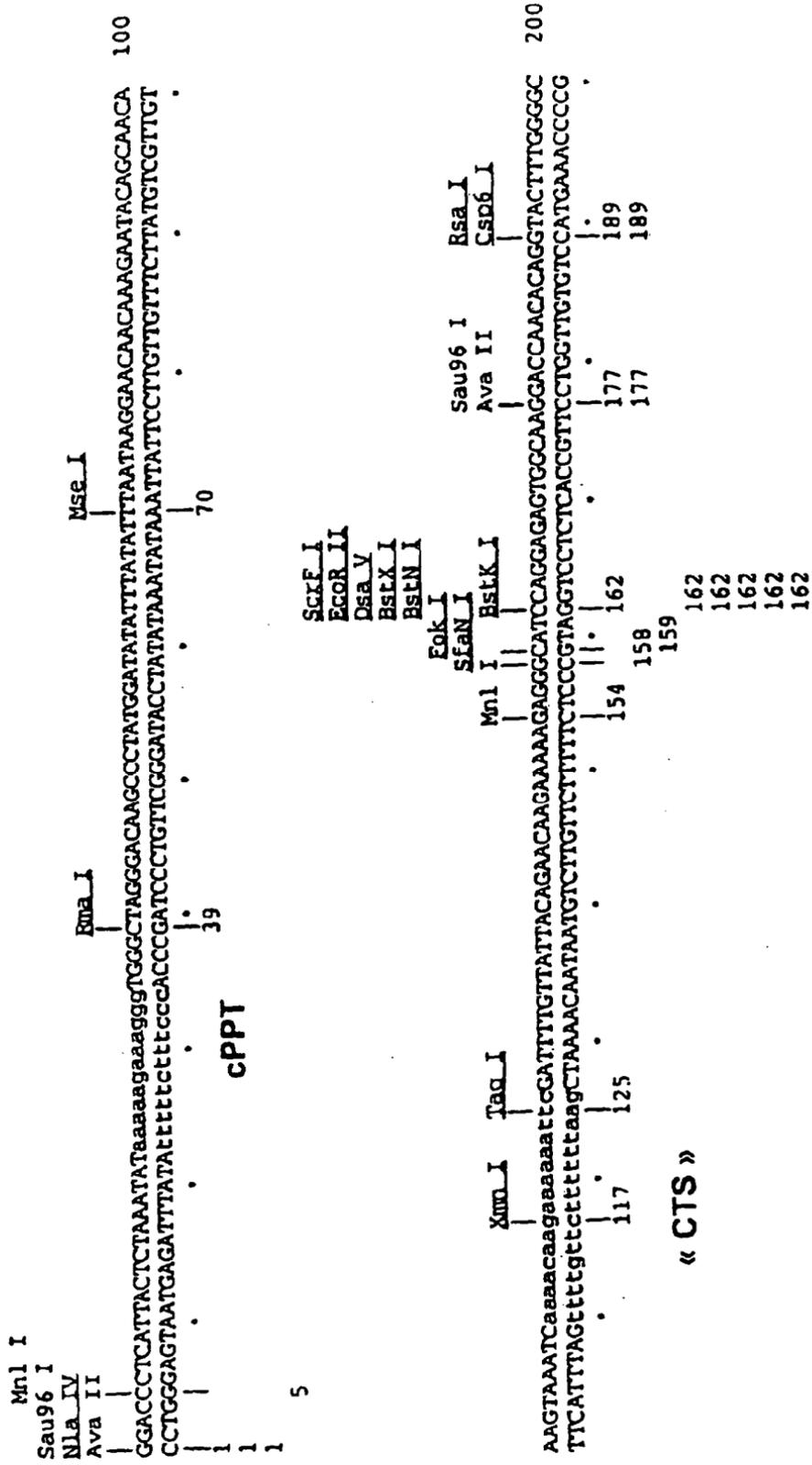


Figura 11C

CADENA TRIPLE DE VIH-2 RID (virus de inmunodeficiencia humana)

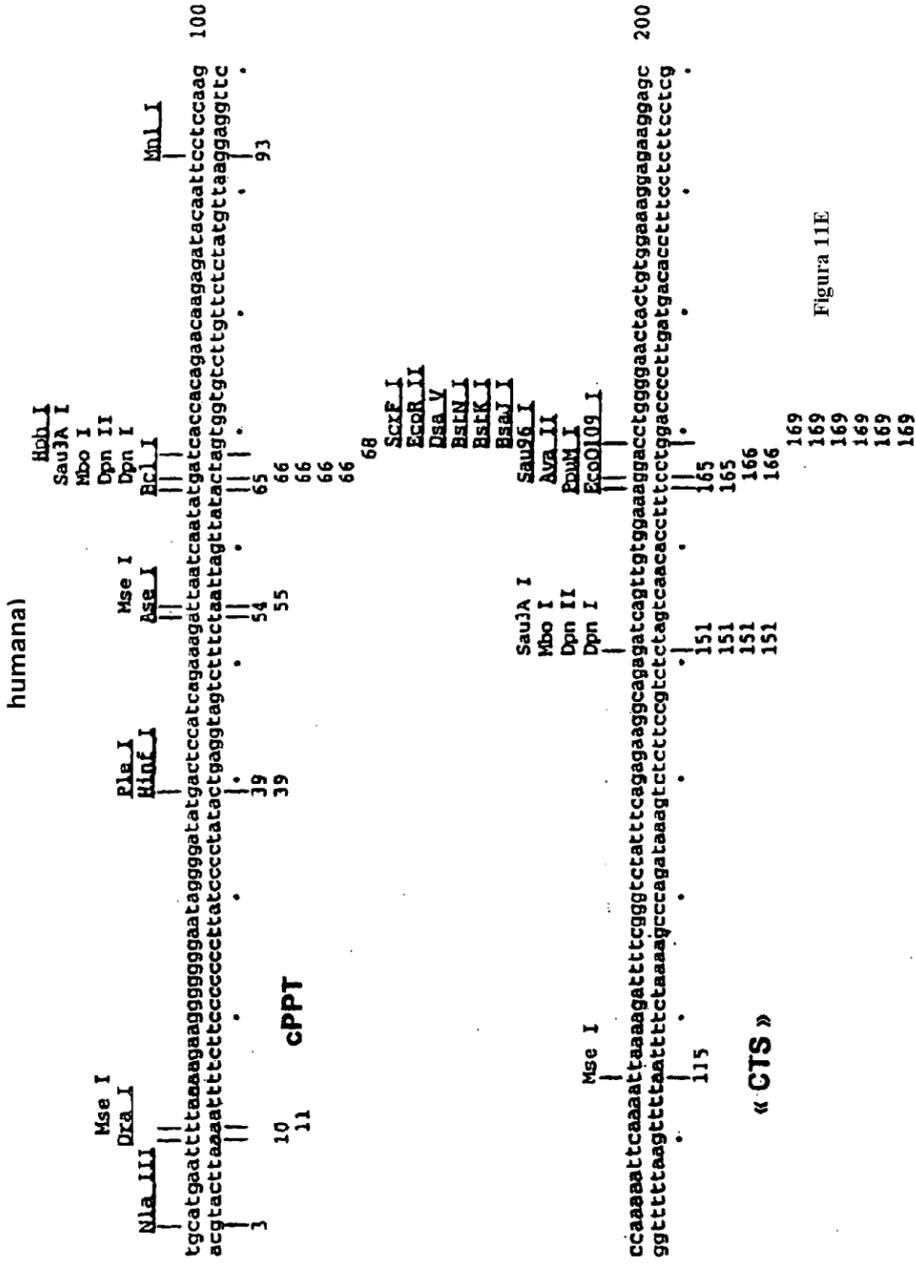


Figura 11E

CADENA TRIPLE DE VIH-1 LAI

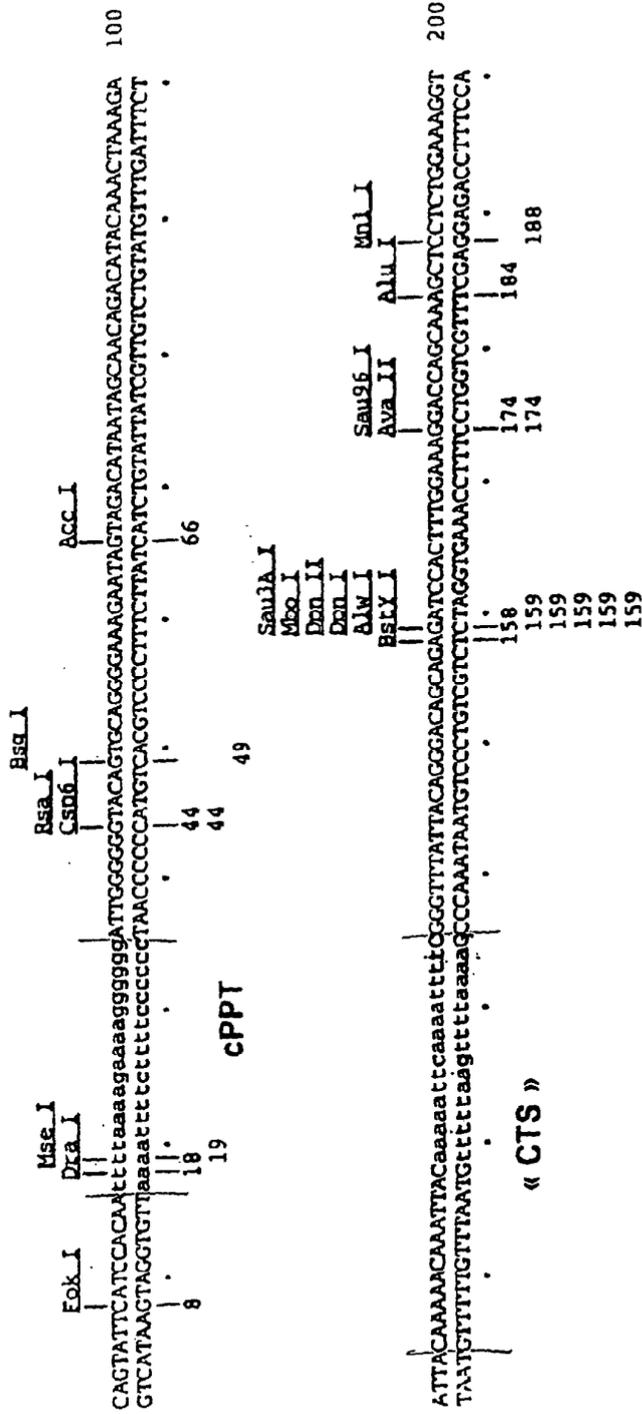


Figura 11F

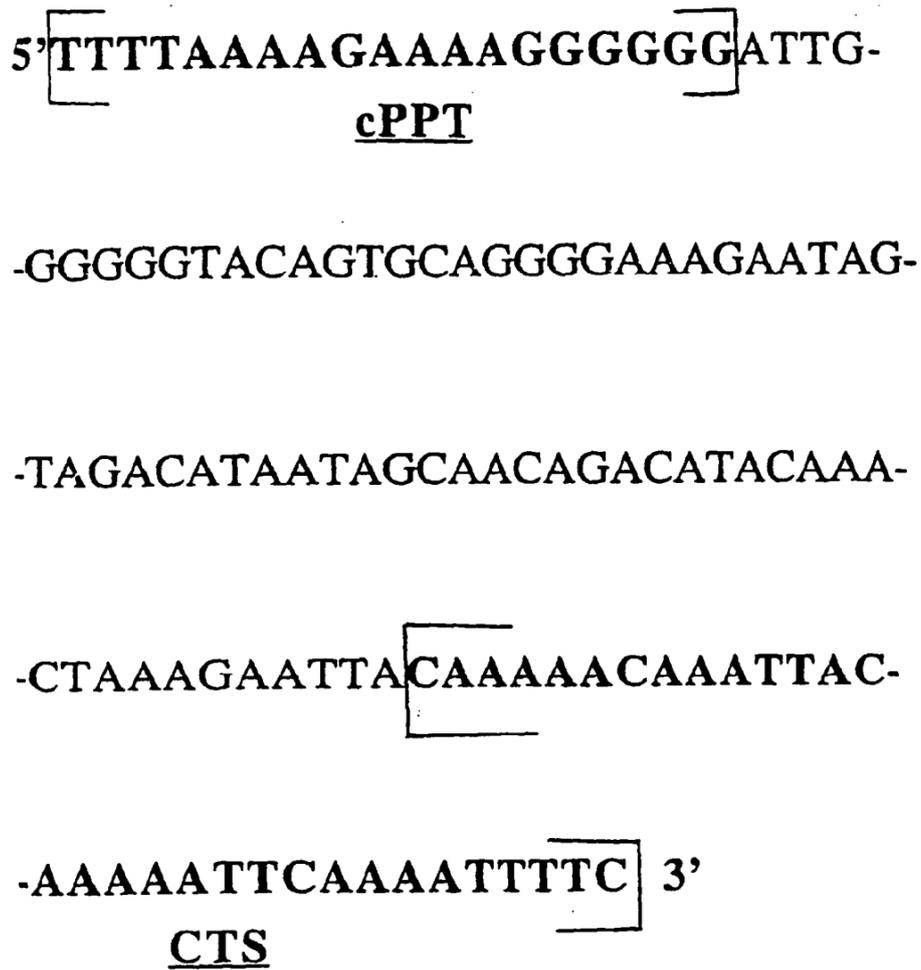


Figura 11G

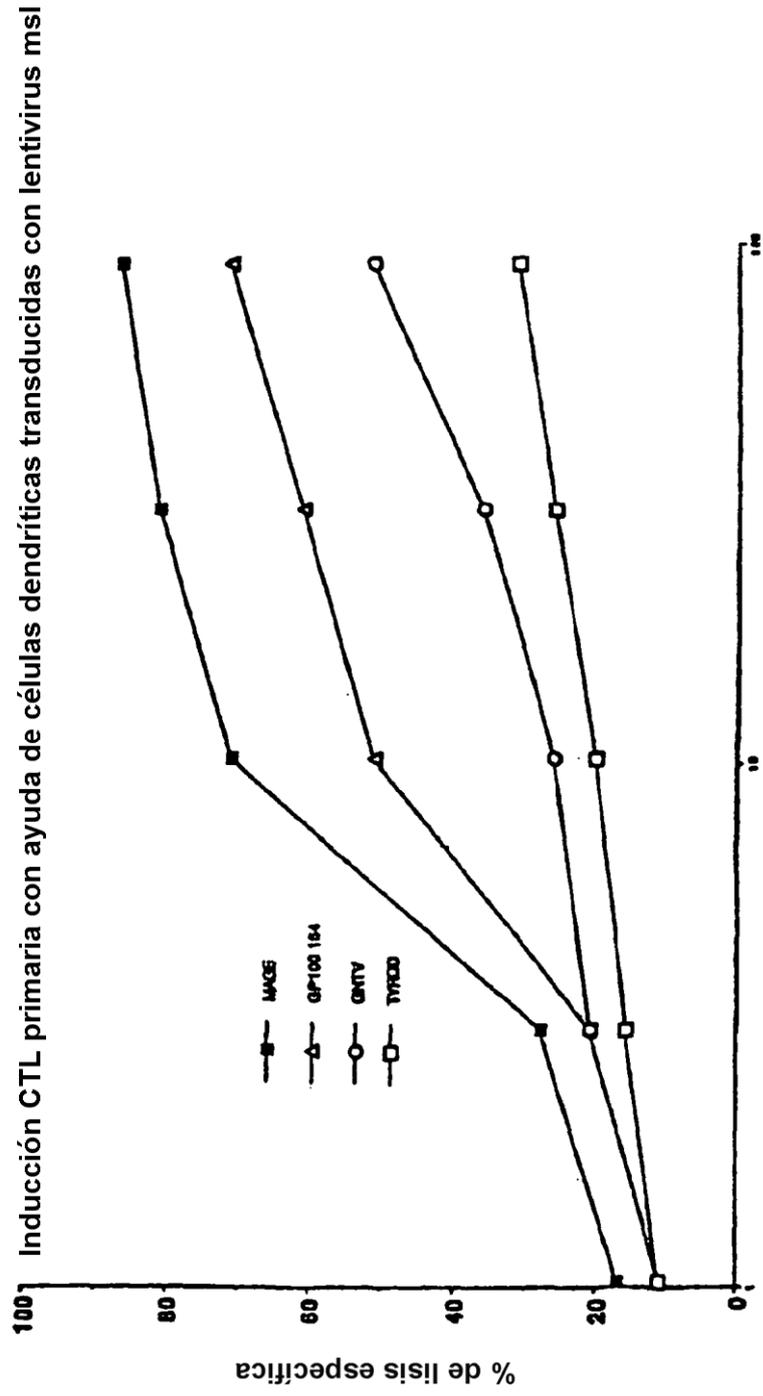
Región de ADN triple del virus VIH-1

Alineamiento de las secuencias cPPT y PPT 3' en algunos lentivirus

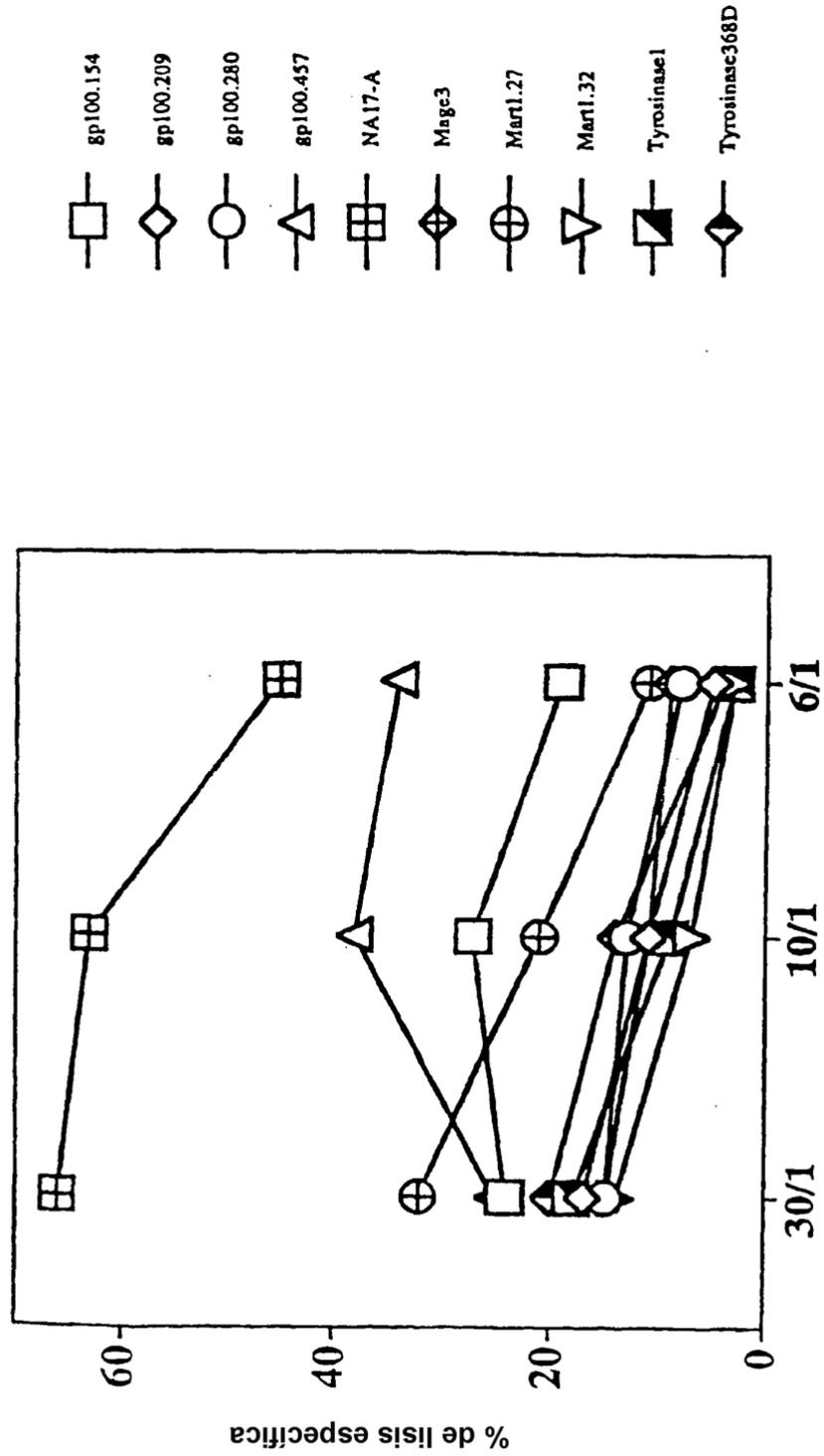
3' PPT PPT central	AAAAGAAAAGGGGGG *****	VIH-1
	AAAACAAGGGGGG ***G*****	VIH-2
	AAAAGAAAAGGGGGG *****GG**A**A	VIS mac y VIH-2_{NDHZ}
	AAAAGAAAAGGGAGG *****G**AG*A	VIS_{agm}
	AAAAAGAAAAAAGAAAGGGTGG ***T*T*****	VISNA
	AAAAATAAAAAAAGAAAGGGTG ***T*****	VEAC
	AACAAGGGGGGAA **AGG*A***A**	VAIE

Figura 11H

FIGURA 12: Inducción de respuestas CTL primarias utilizando células dendríticas humanas transducidas con el vector TRIP-MEL-IRES-GFP

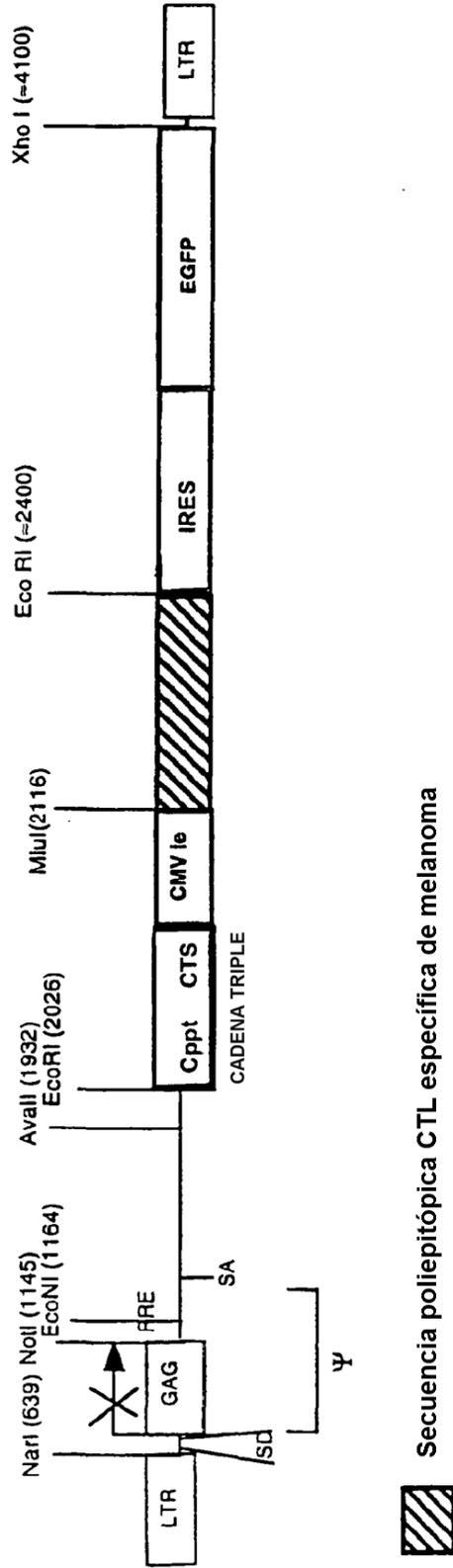


Resultados representativos de la respuesta citotóxica después de inmunización
(intraperitoneal) de ratones HDD con el vector TRIP-MEL-IRES-GFP



E/T Figura 13

MAPA DE RESTRICCIÓN DEL VECTOR pTRIP.MEL-IRES-GFP



Fuente: Charneau
Huesped: JMI09

Figura 14

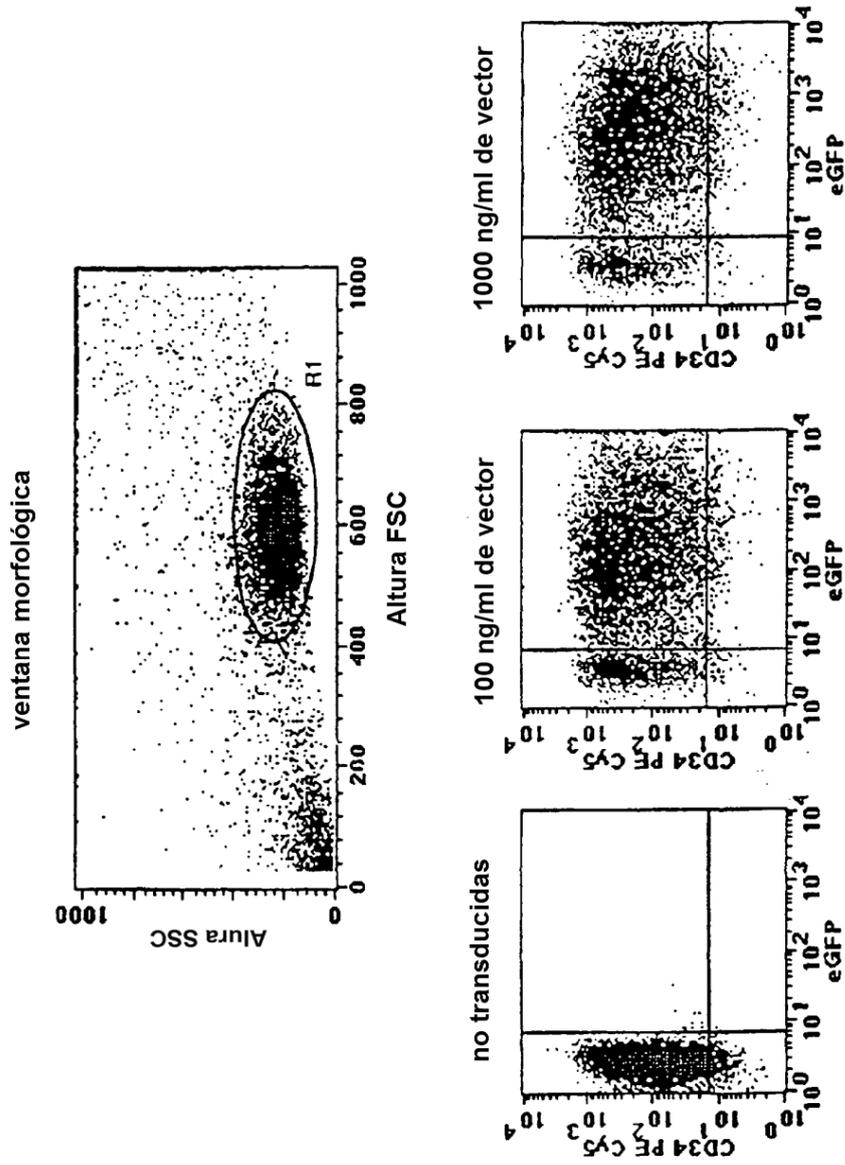
Péptidos epitópicos incluidos en el polipeptido de melanoma

Péptido de melanoma	Secuencia	Referencia
gp100	154-162 KIWGQYWQV	Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8.
	209-217 ITDQVPFSV	Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8.
	280-288 YLEPGPVTA	Cox, AL. Et coll. Science. 1994. 264: 716-9.
	457-466 LLDGTATLRL	Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8.
MART-1	27-35 AAGIGILTV	Kawakami, Y. et coll. J. Immunol. 1995. 154: 3961-8.
	32-40 ILTVILGVL	Castelli, C. et coll. J. Exp. Med. 1995. 181: 363-8.
Tyrosinase	1-9 MLLAVLYCL	Wolfel, T. et coll. Eur. J. Immunol. 1994. 24: 759-64.
	368-376-D YMDGTMSQV	Mosse, CA. et coll. J. Exp. Med. 1998. 187: 37-48.
GnT-V/NA17-A	nE38-64b VLPDVFIRC	Guilloux, Y. et coll. J. Exp. Med. 1996. 183: 1173-83.
MAGE-3	271-279 FLWGPRLV	van der Bruggen, P. et coll. Eur. J. Immunol 1994. 24: 3038-43.

Secuencia de aminoácidos del polipeptido de melanoma

AAGIGILTVFLWGPRLVMLLAVLYCLLLDGTATLRLKTWGQYWQVYMDGTMSQVITDQVPFSVYLEPGPVTAITVLGVLVLPDVFIRC

Figura 15

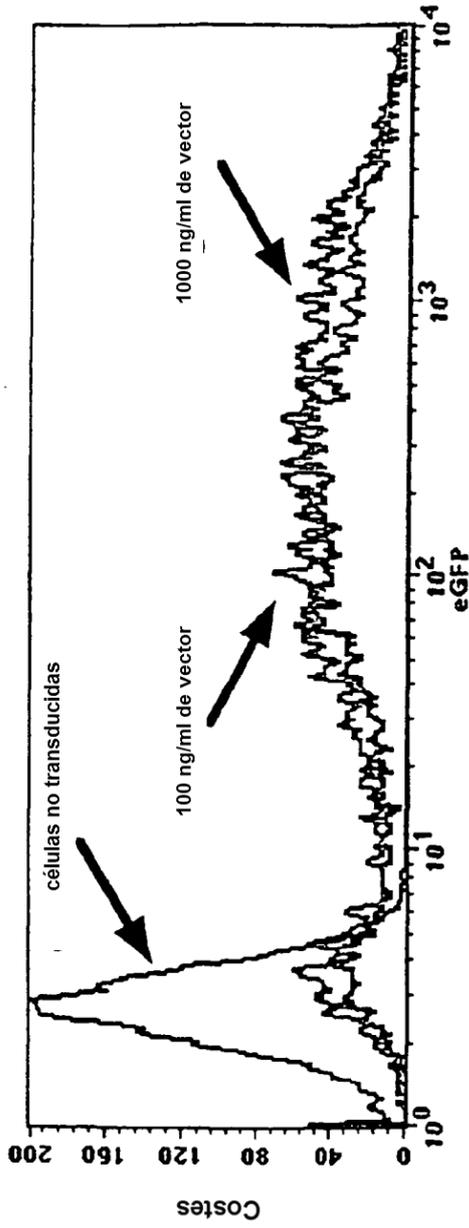


TRANSDUCCIÓN DE EFICACIA MUY ALTA DE CÉLULAS MADRE CD34+ CON

VECTORES DE VIH CON CADENA TRIPLE

Análisis a los 5 días después de la transducción

Figura 16A



**TRANSDUCCIÓN DE EFICACIA MUY ALTA DE CÉLULAS MADRE MADRE CD34+ CON
VECTORES DE VIH CON CADENA TRIPLE**
Análisis a los 5 días después de la transducción

Figura 16B