

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 445**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2003** E 10012126 (8)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** EP 2339010

54 Título: **Partículas de vector de lentivirus resistentes a la inactivación por el complemento**

30 Prioridad:

01.05.2002 US 376767 P

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

28.07.2017

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC TECHNOLOGY, INC. (100.0%)
910 Clopper Road, Suite 200S
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**SCHAUBER, CHERYLENE A. y
PACHECO, CHRISTOPHER D.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 627 445 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

Partículas de vector de lentivirus resistentes a la inactivación por el complemento

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a vectores retrovíricos y a su uso en terapia génica. En particular se refiere a vectores de lentivirus resistentes al complemento. La invención proporciona nuevos vectores de empaquetamiento de lentivirus, estirpes celulares de empaquetamiento estables y estirpes celulares productoras estables.

10

Antecedentes de la invención

Los vectores retrovíricos son una herramienta común para la entrega de genes (Miller, 1992, *Nature* 357:455-460). La biología de la proliferación retroviral permite un uso de este tipo. Normalmente, los ARNm retrovíricos de longitud completa de tipo silvestre sirven como un molde para la síntesis de proteínas víricas y como genoma vírico. Dichos ARNm abarcan una región denominada la señal de encapsidación que se une a ciertas proteínas víricas, garantizando de este modo la asociación específica de ese ARNm con los viriones producidos. Tras la infección de la célula diana, se produce la transcripción inversa del ARNm retroviral en ADN provírico bicatenario. Después, la enzima retroviral, la integrasa, se une a ambas repeticiones terminales largas (LTR, del inglés *long terminal repeats*) que flanquean el ADN provírico y posteriormente cataliza la integración del mismo en el ADN genómico de la célula diana. El ADN provírico integrado sirve como molde para la generación de nuevos ARNm retrovíricos de longitud completa.

15

20

25

30

Se han sometido a ensayo vectores retrovíricos y se descubrió que son vehículos de entrega adecuados para la introducción estable de una diversidad de genes de interés en el ADN genómico de una amplia gama de células diana. La capacidad de los vectores retrovíricos para entregar transgenes de copia única, no reordenados, en una amplia gama de células hace que los vectores retrovíricos estén bien adaptados para la transferencia génica en las células. Desafortunadamente, el uso *in vivo* de los sistemas de entrega de genes retrovíricos se ha visto obstaculizado por la inactivación de los retrovirus por suero humano. Esta inactivación puede ocurrir a través de la lisis de los retrovirus mediada por el complemento.

35

40

Los intentos de proteger los vectores de transferencia génica de la inactivación por el complemento implican la coadministración de una proteína reguladora del complemento (CRP, del inglés *complement regulatory protein*) soluble o la integración de una CRP en la membrana vírica. Se ha utilizado una estrategia con el virus de la leucemia murina, un sistema de entrega retroviral, pero requiere la fusión del dominio catalítico de una CRP a una proteína de envuelta retroviral con el fin de conseguir la incorporación de la CRP en las partículas víricas (Spitzer et al., 1999, *Human Gene Therapy* 10:1893-1902). Otra estrategia ha sido la incorporación de una CRP en la envuelta de baculovirus para crear un vector de baculovirus resistente al complemento para la transferencia génica (Hüser et al., 2001, *Nature Biotechnology* 19:451-455; documento WO 00/77233). Esta estrategia también requiere la fusión del dominio catalítico de la CRP a la proteína de la envuelta de baculovirus.

45

Sigue existiendo una necesidad de sistemas de entrega de genes víricos que eviten las respuestas inmunitarias dirigidas contra el transgén y que resistan a la inactivación por el complemento sin necesidad de la creación de una proteína quimérica que fusione la CRP con una región transmembrana o del uso de un producto administrado por separado.

Sumario de la invención

50

La invención desvelada en el presente documento ofrece un sistema sorprendentemente viable y eficiente para combinar las ventajas de la entrega de genes retrovíricos con resistencia al complemento. La invención proporciona un sistema de empaquetamiento de lentivirus que comprende un conjunto de vectores de lentivirus que comprenden: (a) una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gen gag, un gen pol o genes gag y pol unida operativamente a una secuencia de control de la expresión; (b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen heterólogo de la envuelta unido operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (c)

55

una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína reguladora del complemento (CRP) unida operativamente a una secuencia de control de la expresión; en el que dicho lentivirus resiste la activación del complemento sin necesidad de la creación de una proteína quimérica que fusione la CRP con una región transmembrana y en el que dichas primera, segunda y tercera secuencia de nucleótidos se proporcionan en vectores separados. La invención proporciona adicionalmente una célula de empaquetamiento de lentivirus que comprende: (a) una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gen gag, un gen pol o genes gag y pol; (b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen heterólogo de la envuelta; y (c) una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína reguladora del complemento (CRP);

60

65

en el que dicho lentivirus resiste la activación del complemento sin necesidad de la creación de una proteína quimérica que fusione la CRP a una región transmembrana y en el que dichas primera, segunda y tercera secuencia de nucleótidos se proporcionan en vectores separados. El sistema de empaquetamiento comprende al

menos tres vectores, en el que la segunda secuencia de nucleótidos comprende el gen de la envuelta y no la CRP, y el gen que codifica una CRP se proporciona en un tercer vector.

5 Preferentemente, el gen heterólogo de la envuelta comprende un VSV-G o un gen de la envuelta gp64 de baculovirus. En una realización preferida, el lentivirus es el VIH. Se prefiere un sistema de empaquetamiento de segunda o tercera generación, en el que los vectores carecen de un gen *tat* funcional y/o de genes accesorios funcionales (*vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx*, *nef*). En otra realización preferida, el sistema comprende además una secuencia de nucleótidos adicional que comprende un gen *rev*. El sistema de empaquetamiento puede proporcionarse en forma de un conjunto de vectores de lentivirus o en forma de una célula de empaquetamiento que contiene la primera, la
10 segunda y, opcionalmente, la tercera secuencia de nucleótidos. Preferentemente, los genes codificados por las secuencias de nucleótidos se integran de forma estable en el genoma de la célula de empaquetamiento.

La invención proporciona adicionalmente una célula productora de lentivirus que comprende la célula de empaquetamiento de la invención y un vector de transferencia de lentivirus. La célula productora de la invención es
15 capaz de producir un lentivirus recombinante que lleve un transgén y resiste la inactivación por el complemento. El lentivirus recombinante es capaz de infectar una célula hospedadora, entregando de esta forma el transgén a la célula hospedadora para su expresión.

La divulgación proporciona adicionalmente un método de entrega de un transgén a una célula. El método comprende poner en contacto la célula con un lentivirus recombinante de la invención. En una realización, el transgén es un transgén terapéutico. La célula puede ser *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*.
20

Breve descripción de las figuras

25 La **Figura 1** es un gráfico de barras que muestra que DAF/CD55 confiere resistencia al complemento a Vectores de Lentivirus Pseudotipados con VSVG. Se prepararon vectores de lentivirus que llevaban el transgén GFP y pseudotipados con la glucoproteína de la envuelta de VSV-G mediante transfección transitoria y concentración por ultracentrifugación. Una preparación (VSVG-Sin DAF, izquierda) se hizo en ausencia de cualquier proteína inhibidora del complemento exógena y la otra (VSVG + DAF, derecha) se generó por cotransfección de un plásmido de expresión de mamífero que codifica DAF/CD55. Estas preparaciones de vectores se titularon usando células 293T como dianas. Para determinar la sensibilidad del complemento, se dividieron en mitades muestras de suero de 10 donantes humanos individuales y una mitad se calentó a 56 °C durante una hora para inactivar la actividad del complemento. Las muestras de vectores se expusieron al suero normal (barras blancas) o al inactivado por calor (barras negras) de cada donante durante 1 hora a 37 °C y después se titularon en
30 células 293T. Los valores de los títulos resultantes se presentan como una fracción del título recuperado de una muestra de control que no se expuso al suero (recuperación del título del 100 %).
35

La **Figura 2** es un gráfico de barras que muestra que MCP/CD46 también puede proteger los vectores de lentivirus pseudotipados con VSV-G de la inactivación por el complemento humano. Se sometieron a ensayo
40 vectores de lentivirus con y sin proteínas inhibidoras del complemento para determinar la sensibilidad a la inactivación por el complemento como en la Figura 1. Las muestras de vector analizadas llevaban el transgén GFP y se pseudotiparon con la glucoproteína de la envuelta de VSV-G. Una preparación (VSVG, izquierda) se hizo en ausencia de cualquier proteína inhibidora del complemento exógena y las otras, (VSVG + DAF, medio) y (VSVG + MCP), se generaron por cotransfección de plásmidos de expresión de mamíferos que codifican DAF/CD55 o MCP/CD46, respectivamente. Las muestras de suero eran de cinco donantes humanos individuales.
45

La **Figura 3** es un gráfico de barras que muestra que DAF/CD55 también protege el vector pseudotipado con gp64 de la inactivación por el complemento. Se sometieron a ensayo vectores de lentivirus con y sin proteínas inhibidoras del complemento para determinar la sensibilidad a la inactivación por el complemento como en la
50 Figura 1. Las muestras de vector analizadas llevaban el transgén GFP y se pseudotiparon con la glucoproteína de envuelta gp64 de baculovirus. Una preparación (gp64, izquierda) se hizo en ausencia de cualquier proteína inhibidora exógena del complemento y la otra (gp64 + DAF, derecha) se generó por cotransfección de un plásmido de expresión de mamífero que codifica DAF/CD55. Las muestras de suero eran de cinco donantes humanos individuales.
55

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que las CRP se incorporan de forma natural en partículas de lentivirus y sin necesidad del uso de una molécula química en la que la CRP se fusiona con una proteína transmembrana. Adicionalmente, las partículas de lentivirus recombinantes resultantes tienen una capacidad demostrada para resistir la inactivación del complemento tras la exposición al suero. La divulgación proporciona de este modo una herramienta de terapia génica que ofrece una eficiencia y una eficacia potenciadas.
60

65

Definiciones

5 Todos los términos científicos y técnicos utilizados en la presente solicitud tienen significados de uso común en la técnica a menos que se especifique lo contrario. Como se usa en la presente solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

Como se usan en el presente documento, "un" o "una" significa al menos uno, salvo que se indique claramente lo contrario.

10 Como se usan en el presente documento, "secuencia de nucleótidos", "secuencia de ácidos nucleicos", "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma ya sea monocatenaria o bicatenaria y, a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan a ácidos nucleicos de una forma similar a los nucleótidos de origen natural. Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser, por ejemplo, secuencias procarióticas, secuencias de ARNm eucariótico, secuencias de ADNc a partir de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico a partir de ADN eucariótico (por ejemplo, ADN de mamíferos) y secuencias sintéticas de ADN o ARN, pero no se limitan a las mismas.

20 Como se usa en el presente documento, un "promotor" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos capaz de dirigir la transcripción.

25 Como se usa en el presente documento, "secuencia de control de la expresión" se refiere a una secuencia de ácidos nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o uno inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está unida operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que se transcribe.

30 Como se usa en el presente documento, un "vector de transferencia retroviral" se refiere al vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un transgén y que comprende adicionalmente secuencias de nucleótidos necesarias para el empaquetamiento del vector. Preferentemente, el vector de transferencia retroviral también comprende las secuencias necesarias para expresar el transgén en las células.

35 Como se usan en el presente documento, "partícula de vector", "partícula retroviral", "partícula vírica", "partícula de vector retroviral" se refieren a un retrovirus de replicación defectuosa que lleva un ARN transcrito a partir de un vector retroviral de la presente divulgación. Preferentemente, el ARN comprende una secuencia de transgenes (ARN de transgenes) transcrita a partir de un vector de transferencia retroviral de la presente divulgación.

40 Como se usa en el presente documento, "sistema de empaquetamiento" se refiere a un conjunto de construcciones víricas que comprenden genes que codifican proteínas víricas implicadas en el empaquetamiento de un virus recombinante. Normalmente, las construcciones del sistema de empaquetamiento se incorporarán en última instancia en una célula de empaquetamiento.

45 Como se usa en el presente documento, un sistema de vectores de lentivirus de "segunda generación" se refiere a un sistema de empaquetamiento de lentivirus que carece de genes accesorios funcionales, tal como uno del que se han suprimido o inactivado los genes accesorios vif, vpr, vpu y nef. Véase, por ejemplo, Zufferey et al., 1997, *Nat. Biotechnol.* 15: 871-875.

50 Como se usa en el presente documento, un sistema de vectores de lentivirus de "tercera generación" se refiere a un sistema de empaquetamiento de lentivirus que tiene las características de un sistema de vectores de segunda generación y que adicionalmente carece de un gen tat funcional, tal como uno del que se ha suprimido o inactivado el gen tat. Normalmente, el gen que codifica rev se proporciona en una construcción de expresión separada. Véase, por ejemplo, Dull et al., 1998, *J. Virol.* 72 (11): 8463-8471.

55 Como se usa en el presente documento, "pseudotipado" se refiere al reemplazo de una proteína de la envuelta nativa con una proteína heteróloga de la envuelta o funcionalmente modificada.

60 Como se usa en el presente documento, "heterólogo" se refiere a lo que no es endógeno o de origen natural en una secuencia, molécula (incluyendo, por ejemplo, una proteína), célula, tejido u organismo referenciados. Por ejemplo, una secuencia heteróloga puede derivar de una especie diferente o de la misma especie pero modificada sustancialmente a partir de una forma original. También, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que normalmente no se expresa en una célula es una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga.

65 Como se usa en el presente documento, una proteína "modificada funcionalmente" se refiere a una proteína que tiene una actividad o propiedad diferente o alterada de la proteína de la que deriva la proteína modificada funcionalmente. Preferentemente, una proteína heteróloga de la envuelta o modificada funcionalmente tiene una especificidad celular o de unión diferente en comparación con la proteína de la envuelta de la que deriva la proteína heteróloga o modificada funcionalmente. Una proteína de la envuelta funcionalmente modificada puede generarse

por la modificación (por ejemplo, por mutación puntual, supresión, fusión o acoplamiento químico) de una proteína de la envuelta de la que deriva. Por ejemplo, una proteína de la envuelta modificada funcionalmente puede ser una proteína de la envuelta que tiene una mutación y/o supresión, en comparación con la proteína de la envuelta de la que derivó. También, por ejemplo, una proteína de la envuelta modificada funcionalmente puede ser una proteína de la envuelta que está fusionada o acoplada con un ligando que se une a una diana celular específica (por ejemplo, un receptor) y, de este modo, la especificidad celular y/o de unión de la proteína de la envuelta se altera, en comparación con la proteína de la envuelta de la que derivó.

Como se usa en el presente documento, un gen de "gp64" se refiere a un gen de la envuelta gp64 de baculovirus. La secuencia de un gen de gp64 puede derivar de la familia Baculoviridae. Se describen genes gp64 representativos y métodos para su preparación en Monsma y Blissard, 1995, *J. Virol.* 69(4): 2583-95; Blissard y Rohrmann, 1989, *Virology* 170(2): 537-55; y Blissard y Monsma, Patentes de los EE.UU. N.º 5.750.383 y 5.750.383. El gen de gp64 u otro gen de la envuelta de baculovirus pueden ser de la familia Baculoviridae. Por ejemplo, el gen de gp64 u otro gen de la polihedrosis nuclear de *Anagrapha falcifera*, del virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori*, del nucleopoliedrovirus de *Choristoneura fumiferana*, del virus de cápside simple de la polihedrosis nuclear de *Orgyia pseudotsugata*, del nucleopoliedrovirus de *Epiphyas postvittana*, del nucleopoliedrovirus de *Hyphantria cunea*, del virus de la polihedrosis nuclear de *Galleria mellonella*, del *Dhori virus*, del *Thogoto virus*, del nucleopoliedrovirus de *Antheraea pernyi* o del virus de Batken. Preferentemente, el gen de la envuelta gp64 es un gen de la envuelta gp64 del AcMNPV.

"Gen" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar un polipéptido o proteína.

Como se usa en el presente documento, "transgén" se refiere a un polinucleótido que puede expresarse, a través de técnicas recombinantes, en un entorno no nativo o una célula heteróloga en las condiciones apropiadas. El transgén puede derivar del mismo tipo de célula en la que se expresa, pero introducido desde una fuente exógena, modificado en comparación con una forma nativa correspondiente y/o expresado a partir de un sitio no nativo o puede derivar de una célula heteróloga. "Transgén" es sinónimo de "gen exógeno", "gen extraño" y "gen heterólogo".

Como se usa en el presente documento, un gen "terapéutico" se refiere a un gen que, cuando se expresa, confiere un efecto beneficioso a la célula o el tejido en los que está presente o en un mamífero en el que se expresa el gen. Los ejemplos de efectos beneficiosos incluyen la mejora de un signo o síntoma de una afección o enfermedad, la prevención o inhibición de una afección o enfermedad o la atribución de una característica deseada. Los genes terapéuticos incluyen genes que corrigen una deficiencia genética en una célula o mamífero.

Como se usa en el presente documento, "sujeto" se refiere al destinatario de la terapia que se pone en práctica de acuerdo con la divulgación. El sujeto puede ser cualquier animal, incluyendo un vertebrado, pero preferentemente será un mamífero. Si es un mamífero, el sujeto será preferentemente un ser humano, pero también puede ser ganado doméstico, un sujeto de laboratorio o un animal doméstico.

Como se usa en el presente documento, "toxicidad significativa" se refiere a un nivel de toxicidad que contraindica el uso clínico como se determina por una medición de toxicidad aceptada en la técnica. Los ejemplos de mediciones de toxicidad aceptadas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, los niveles séricos elevados de una enzima u otra sustancia asociada a la toxicidad hepática, tal como sGPT, creatinina, fosfatasa alcalina y alanina aminotransferasa (ALT). Los niveles séricos elevados pueden significar mayor que el límite superior del intervalo normal.

Como se usa en el presente documento, "citotoxicidad" se refiere a un nivel de toxicidad que da como resultado la muerte celular, la detención del crecimiento celular o la inactivación de las funciones celulares importantes para la viabilidad de una célula.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente aceptable" de una sustancia se refiere a una cantidad suficiente de la sustancia para que pueda detectarse una mejora de los síntomas adversos o una protección contra los síntomas adversos en un sujeto tratado con la sustancia.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite que el principio activo conserve la actividad biológica y no sea reactivo con el sistema inmunitario del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para la administración en aerosol o parenteral son la solución salina tamponada con fosfato o la solución salina normal (0,9%). Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan mediante métodos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990).

Se hace referencia en el presente documento a técnicas conocidas habitualmente en la técnica. Puede encontrarse orientación en la aplicación de dichas técnicas, por ejemplo, en Ausubel et al. ed., 1995, *Current Protocols in Molecular Biology* y en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

5

Sistemas de empaquetamiento

La presente invención proporciona sistemas de empaquetamiento de lentivirus que comprenden un conjunto de tres vectores de lentivirus que comprende: (a) una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gen gag, un gen pol o genes gag y pol unida operativamente a una secuencia de control de la expresión; (b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen heterólogo de la envuelta unida operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (c) una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína reguladora del complemento (CRP) unida operativamente a una secuencia de control de la expresión;

10

en los que dicho lentivirus resiste la activación del complemento sin necesidad de la creación de una proteína quimérica que fusione CRP con una región transmembrana y en los que dichas primera, segunda y tercera secuencia de nucleótidos se proporcionan en vectores separados. El gen que codifica una CRP y el gen de la envuelta se proporcionan en construcciones separadas. La invención proporciona adicionalmente una célula de empaquetamiento de lentivirus que comprende: (a) una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gen gag, un gen pol o genes gag y pol; (b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen heterólogo de la envuelta; y (c) una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína reguladora del complemento (CRP);

15

20

en los que dicho lentivirus resiste la activación del complemento sin necesidad de la creación de una proteína quimérica que fusione CRP con una región transmembrana y en los que dichas primera, segunda y tercera secuencia de nucleótidos se proporcionan en vectores separados.

25

En realizaciones preferidas, la CRP es un factor de aceleración de la desintegración (DAF, del inglés *decay-accelerating factor*), también conocido como CD55, una proteína de membrana anclada a glucosil-fosfatidilinositol que regula la activación del complemento en las superficies celulares (Nicholson-Weller y Wang, 1994, *J. Lab. Clin. Med.* 123(4): 485-91). El DAF puede obtenerse de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE.UU.), donde un clon de ADNc humano disponible que expresa DAF se designa N.º de registro de ATCC 5530612. Se conocen en la técnica otras moléculas de DAF, tales como N.º de registro de GenBank M31516; véase también Brodbeck et al., 1996, *J. Immunol.* 156: 2528-2533.

30

Otras CRP incluyen proteína de cofactor de membrana (MCP del inglés *membrane cofactor protein*; una proteína transmembrana clásica), el receptor del complemento 1 (CR1), el factor homólogo de restricción (HRF, del inglés *homologous restriction factor*) y CD59. Como DAF, CD59 está anclado mediante un anclaje de glucosil-fosfatidilinositol que se añade en el retículo endoplasmático. Se cree que DAF, CR1 y MCP bloquean la cascada del complemento mediante la restricción de la actividad de la enzima convertasa de C3/C5, mientras que se considera que CD59 y HRF actúan mediante la inhibición de la formación del complejo de ataque de la membrana.

40

Los elementos retrovíricos derivan de un lentivirus, tal como el VIH. Preferentemente, los vectores carecen de un gen tat funcional y/o de genes accesorios funcionales (vif, vpr, vpu, vpx, nef). El sistema comprende adicionalmente un tercer vector de empaquetamiento que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un gen rev. El sistema de empaquetamiento puede proporcionarse en forma de una célula de empaquetamiento que contiene la primera, la segunda y la tercera secuencia de nucleótidos.

45

La divulgación es aplicable a una diversidad de sistemas retrovíricos y los expertos en la materia apreciarán los elementos comunes compartidos entre diferentes grupos de retrovirus. La descripción del presente documento usa sistemas de lentivirus como un ejemplo representativo. Sin embargo, todos los retrovirus comparten las características de los viriones con envuelta con proyecciones superficiales y que contienen una molécula de ARN monocatenario, lineal, de sentido positivo, un genoma que consiste en un dímero y las proteínas comunes gag, pol y env.

50

Los lentivirus comparten varias proteínas viriónicas estructurales en común, incluyendo las glucoproteínas de la envuelta SU (gp120) y TM (gp41), que son codificadas por el gen env; CA (p24), MA (p17) y NC (p7-11), que son codificadas por el gen gag; y RT, PR e IN codificadas por el gen pol. El VIH-1 y el VIH-2 contienen proteínas accesorias y otras proteínas implicadas en la regulación de la síntesis y el procesamiento del ARN del virus y otras funciones replicativas. Las proteínas accesorias, codificadas por los genes vif, vpr, vpu/vpx y nef, pueden omitirse (o inactivarse) a partir del sistema recombinante. Además, tat y rev pueden omitirse o inactivarse, por ejemplo, por mutación o supresión.

60

Los sistemas de empaquetamiento de vectores de lentivirus de primera generación proporcionan construcciones de empaquetamiento separadas para gag/pol y env, y normalmente emplean una proteína de envuelta heteróloga o modificada funcionalmente por razones de seguridad. En los sistemas de vectores de lentivirus de segunda generación, los genes accesorios, vif, vpr, vpu y nef, se suprimen o se inactivan. Los sistemas de vectores de lentivirus de tercera generación son aquellos en los que se ha suprimido o inactivado de otro modo el gen tat (por

65

ejemplo, mediante mutación).

La compensación para la regulación de la transcripción normalmente proporcionada por tat puede proporcionarse mediante el uso de un promotor constitutivo fuerte, tal como el potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (HCMV-IE). Pueden seleccionarse otros promotores/potenciadores basándose en la fuerza de la actividad constitutiva del promotor, la especificidad para el tejido diana (por ejemplo, el promotor específico del hígado) u otros factores relacionados con el control sobre la expresión deseado, como se entiende en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, es deseable emplear un promotor inducible tal como tet para conseguir la expresión controlada. El gen que codifica rev se proporciona preferentemente en una construcción de expresión separada, de manera que un sistema de vectores de lentivirus de tercera generación típico implicará cuatro plásmidos: uno para cada uno para gagpol, rev, envuelta y el vector de transferencia. Independientemente de la generación del sistema de empaquetamiento empleado, gag y pol pueden proporcionarse en una única construcción o en construcciones separadas.

Los vectores de empaquetamiento de la presente invención comprenden uno o más genes que codifican elementos de empaquetamiento retrovíricos, en los que cada gen está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión. En una realización, el vector es un plásmido. Además, se conocen en la técnica otros vectores adecuados para su uso en los sistemas de empaquetamiento de la presente invención e incluyen, por ejemplo, vectores víricos.

Normalmente, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula de empaquetamiento y se introducen en la célula a través de transfección, transducción o infección. Los métodos para la transfección, transducción o infección son bien conocidos por los expertos en la materia. Un vector de transferencia de lentivirus de la presente invención puede introducirse en una estirpe celular de empaquetamiento, a través de transfección, transducción o infección, para generar una célula o estirpe celular productora. En consecuencia, la presente invención proporciona adicionalmente células y estirpes celulares productoras que comprenden el sistema de empaquetamiento de la invención y un vector de transferencia de lentivirus. Las células o estirpes celulares productoras de la presente invención son capaces de producir un retrovirus recombinante que está pseudotipado con una proteína heteróloga de la envuelta o modificada funcionalmente (por ejemplo, una proteína de la envuelta de baculovirus) y lleva un transgén. Las células y estirpes celulares productoras pueden cultivarse en medios y el retrovirus pseudotipado puede recuperarse de los medios de cultivo y puede titularse mediante métodos convencionales. Adicionalmente, el retrovirus pseudotipado es capaz de infectar una célula hospedadora y, de este modo, entregar el transgén a la célula hospedadora de manera que el transgén se exprese en la célula hospedadora.

Los vectores de empaquetamiento de la presente invención pueden introducirse en células o estirpes celulares humanas por métodos convencionales incluyendo, por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, lipofección o electroporación. En algunas realizaciones, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador seleccionable dominante, tal como neo, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de la selección en presencia del fármaco apropiado y el aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable puede estar unido físicamente a genes codificados por el vector de empaquetamiento.

Se conocen estirpes celulares estables, en las que las funciones de empaquetamiento están configurados para ser expresadas por una célula de empaquetamiento adecuada. Por ejemplo, véase la Patente de los EE.UU. N.º 5.686.279; y Ory et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996) 93: 11400-11406, que describen células de empaquetamiento. Puede encontrarse una descripción adicional de la producción de estirpes celulares estables en Dull et al., 1998, *J. Virology* 72 (11): 8463-8471; y en Zufferey et al., 1998, *J. Virology* 72 (12): 9873-9880.

Zufferey et al., 1997, *Nature Biotechnology* 15: 871-875, enseñan un plásmido de empaquetamiento de lentivirus en el que se suprimen secuencias 3' de pol incluyendo el gen de la envuelta del VIH-1. La construcción contiene las secuencias de tat y rev y la 3'LTR se reemplaza por secuencias poli A. Las secuencias 5'LTR y psi se reemplazan por otro promotor, tal como uno que es inducible. Por ejemplo, puede usarse un promotor de CMV o un derivado del mismo.

Los vectores de empaquetamiento de interés pueden contener cambios adicionales a las funciones de empaquetamiento para potenciar la expresión de proteínas de lentivirus y para potenciar la seguridad. Por ejemplo, todas las secuencias de VIH corriente arriba de gag pueden eliminarse. También las secuencias corriente abajo de la envuelta pueden eliminarse. Por otra parte, pueden tomarse medidas para modificar el vector para potenciar el corte y empalme y la traducción del ARN.

Opcionalmente, se usa un sistema de empaquetamiento condicional, tal como el descrito por Dull et al., 1998, *J. Virology* 72 (11): 8463-8471. También se prefiere el uso de un vector de autoinactivación (SIN, del inglés *self-inactivating vector*), que mejora la bioseguridad del vector mediante la supresión de la repetición terminal larga (LTR) del VIH-1 como se describe, por ejemplo, por Zufferey et al., 1998, *J. Virology* 72 (12): 9873-9880. También pueden usarse vectores inducibles, tales como a través de una LTR inducible por tet.

65

Vectores retrovéricos y retrovirus

La presente divulgación también proporciona métodos de producción de lentivirus recombinantes. Los métodos comprenden transformar una célula hospedadora con un vector de empaquetamiento que comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gag, un pol o genes gag y pol; y un segundo vector de empaquetamiento que comprende secuencias de nucleótidos que comprenden un gen que codifica una CRP. Opcionalmente, la segunda secuencia de nucleótidos incluye adicionalmente un gen de la envuelta heterólogo o modificado funcionalmente. Como alternativa, el gen de la envuelta se proporciona en un vector de empaquetamiento por separado. Preferentemente, la CRP comprende un DAF.

Los vectores de lentivirus de la presente invención, incluyen, por ejemplo, vectores de transferencia retrovéricos que comprenden una o más secuencias de transgenes y vectores de empaquetamiento retrovéricos que comprenden uno o más elementos de empaquetamiento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona vectores de lentivirus pseudotipados que codifican una proteína heteróloga de la envuelta para producir lentivirus pseudotipados.

La secuencia de una proteína heteróloga de la envuelta de la presente invención puede derivar de la secuencia de una proteína de la envuelta de la familia Baculoviridae. Preferentemente, la secuencia de la proteína heteróloga de la envuelta de la presente invención deriva de la de proteína de la envuelta de baculovirus gp64. Se conocen genes de gp64 representativos y métodos para su preparación y se describen, por ejemplo, en Monsma y Blissard, 1995, *J. Virol.* 69(4): 2583-95; Blissard y Rohrmann, 1989, *Virology* 170(2): 537-55; y Blissard y Monsma, Patentes de los EE.UU. N.º 5.750.383 y 5.750.383. Por ejemplo, un gen de gp64 u otros genes de la envuelta de baculovirus pueden derivar del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV), del virus de la polihedrosis nuclear de *Anagrapha falcifera*, del virus de la polihedrosis nuclear de *Bombyx mori*, del nucleopoliedrovirus de *Choristoneura fumiferana*, del virus de cápside simple de la polihedrosis nuclear de *Orgyia pseudotsugata*, del nucleopoliedrovirus de *Epiphyas postvittana*, del nucleopoliedrovirus de *Hyphantria cunea*, del virus de la polihedrosis nuclear de *Galleria mellonella*, del *Dhori virus*, del *Thogoto virus*, del nucleopoliedrovirus de *Antheraea pernyi* o del virus de Batken. Preferentemente, el gen de la envuelta gp64 es un gen de la envuelta gp64 del AcMNPV.

Sin embargo, las proteínas heterólogas de la envuelta de la presente invención no se limitan a los baculovirus. Por ejemplo, proteínas de la envuelta heterólogas o modificadas funcionalmente adecuadas pueden derivar de una proteína de la envuelta de un virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV o MMLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV o HSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV o MMTV), el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV o GALV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus del sarcoma de Rous (RSV).

La secuencia central de los vectores retrovéricos de la presente divulgación puede derivar fácilmente de una amplia diversidad de retrovirus, incluyendo por ejemplo, los retrovirus de tipo B, C y D, así como espumavirus y lentivirus (véase *RNA Tumor Viruses*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985). Un retrovirus adecuado para su uso en las composiciones y métodos de la presente invención es el lentivirus. Otros retrovirus adecuados para su uso en las composiciones y métodos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, el Virus de la Leucosis Aviar, el Virus de la Leucemia Bovina, el Virus de la Leucemia Murina, el Virus Inductor de Foco Celular de Visón, el Virus del Sarcoma Murino, el Virus de la Reticuloendoteliosis y el Virus del sarcoma de Rous. Los Virus de Leucemia Murina particularmente preferidos incluyen 4070A y 1504A (Hartley y Rowe, *J. Virol.* 19: 19-25, 1976), Abelson (N.º de ATCC VR-999), Friend (N.º de ATCC VR-245), Graffi, Gross (N.º de ATCC VR-590), Kirsten, Virus del Sarcoma de Harvey y Rauscher (N.º de ATCC VR-998) y el Virus de la Leucemia Murina de Moloney (N.º de ATCC VR-190). Dichos retrovirus pueden obtenerse fácilmente a partir de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"; Rockville, Md.) o pueden aislarse de fuentes conocidas usando técnicas habitualmente disponibles.

Una secuencia de vector retrovérico de la presente invención deriva de un lentivirus. Un lentivirus preferido es un virus de la inmunodeficiencia humana, por ejemplo, de tipo 1 o 2 (es decir, VIH-1 o VIH-2, en los que el VIH-1 se denominaba anteriormente virus asociado a la linfadenopatía 3 (HTLV-III) y virus relacionado con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (ARV)) u otro virus relacionado con el VIH-1 o el VIH-2 que se haya identificado y asociado al SIDA o a la enfermedad similar al SIDA. Otros lentivirus incluyen, un virus Visna/maedi ovino, un virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), un lentivirus bovino, un virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), un virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y un virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC).

Los diversos géneros y cepas de retrovirus adecuados para su uso en las composiciones y métodos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Fields Virology*, Tercera Edición, editado por B.N. Fields et al., Lippincott-Raven Publishers (1996), véase, por ejemplo, *Chapter 58, Retroviridae: The Viruses and Their Replication, Classification*, páginas 1768-1771, incluyendo la Tabla 1.

Como se usa en el presente documento, una primera secuencia de polinucleótidos "deriva de" una segunda secuencia de polinucleótido si tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de pares de bases que una región de la segunda secuencia de polinucleótidos, su ADNc, complementos de la misma o si presenta identidad de secuencia como se ha descrito anteriormente. De forma similar, una primera secuencia de polipéptidos "deriva de"

una segunda secuencia de polipéptidos si (i) está codificada por una primera secuencia de polinucleótidos derivada de una segunda secuencia de polinucleótidos o (ii) presenta identidad de secuencia con la segunda secuencia de polipéptidos como se ha descrito anteriormente.

5 Pueden compararse dos o más secuencias de polinucleótidos mediante la determinación de su "porcentaje de identidad". Del mismo modo pueden compararse dos o más secuencias de aminoácidos mediante la determinación de su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácidos nucleicos o de péptidos, se describe generalmente como el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas, dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Un alineamiento aproximado
10 para secuencias de ácidos nucleicos es proporcionado por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981). Este algoritmo puede extenderse al uso con secuencias de péptidos usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 supl. 3: 353-358, Fundación Estadounidense de Investigación Biomédica, Washington, D.C., EE.UU. y normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14 (6): 6745-6763. Una implementación de este algoritmo para
15 secuencias de ácidos nucleicos y péptidos se proporciona por el Genetics Computer Group (Madison, Wis.) en su aplicación de utilidad BestFit. Los parámetros por defecto para este método se describen en el *Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual*, Versión 8 (1995) (disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wis.). En general, se conocen en la técnica otros programas igualmente adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias.

20 Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia puede determinarse usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos. Otro método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH registrado por la
25 Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, Calif.). A partir de este juego de paquetes, el algoritmo de Smith-Waterman puede emplearse cuando se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor de "Coincidencia" refleja la "identidad de secuencia". En general, se conocen en la técnica otros programas
30 adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias, tales como el programa de alineación BLAST, que también puede usarse con los parámetros por defecto. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de Internet: página web del NCBI.

35 Un experto en la materia puede determinar fácilmente los parámetros de búsqueda apropiados que se han de usar para una secuencia dada en los programas anteriores. Por ejemplo, los parámetros de búsqueda pueden variar en función del tamaño de la secuencia en cuestión. De este modo, por ejemplo, una realización representativa de la presente invención incluiría un polinucleótido aislado que tiene X nucleótidos contiguos, en el que (i) los X
40 nucleótidos contiguos tienen al menos aproximadamente el 50 % de identidad con los Y nucleótidos contiguos derivados de cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento, (ii) X es igual a Y, y (iii) X es mayor o igual a 6 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, preferentemente mayor o igual a 8 nucleótidos y hasta 5000
nucleótidos, más preferentemente 10-12 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos y aún más preferentemente 15-20 nucleótidos, hasta el número de nucleótidos presentes en las secuencias de longitud completa descritas en el presente documento (por ejemplo, véase el Listado de secuencias y las reivindicaciones), incluyendo todos los
45 valores enteros que pertenecen a los intervalos descritos anteriormente.

En realizaciones preferidas, una secuencia de vector de lentivirus de la presente invención que comprende un gen de CRP, un gen de empaquetamiento, un gen de transferencia o un gen heterólogo de la envuelta, está unida operativamente con al menos un regulador de secuencia, por ejemplo, un promotor y/o potenciador. La secuencia reguladora puede ser cualquier promotor y/o potenciador eucariótico, incluyendo por ejemplo, el elemento promotor-potenciador del virus de la leucemia murina de Moloney, el potenciador de citomegalovirus humano o el promotor del virus de la variolovacuna P7.5. En algunos casos, el elemento promotor-potenciador del virus de la leucemia murina de Moloney, los elementos promotores-potenciadores están situados dentro o adyacentes a las secuencias LTR.

50 Preferentemente, la secuencia reguladora es una que no sea endógena del lentivirus del que deriva la secuencia del vector retroviral. Por ejemplo, la secuencia reguladora de lentivirus descubierta en las LTR de lentivirus puede reemplazarse por un elemento regulador que no se origina a partir del lentivirus.

60 Las secuencias del vector de lentivirus empleadas en los vectores de empaquetamiento y los vectores de transferencia de lentivirus de la presente invención incluyen al menos un elemento o elementos que definen el locus u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios tales como el corte y empalme alternativo, la exportación de ARN nuclear, la modificación postraduccional del mensajero o la modificación postranscripcional de la proteína. Dichas secuencias de vectores también incluyen preferentemente una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) o una parte de las mismas y sitios de unión al cebador de cadena positiva y negativa apropiados para el retrovirus utilizado (si estos no están ya presentes en la secuencia del vector retroviral). Opcionalmente, una secuencia de vector de lentivirus de la presente invención puede incluir una señal
65 que dirija la poliadenilación, marcadores seleccionables tales como resistencia a la neomicina, TK, resistencia a la

higromicina, resistencia a la fleomicina, resistencia al histidinol o DHFR, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. En algunas realizaciones, las secuencias del vector de lentivirus de la presente invención incluyen una 5'LTR, un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de la segunda cadena de ADN y una 3'LTR o una porción de la misma.

5 Se conocen sitios de unión a ARNt y orígenes de síntesis del ADN de segunda cadena y pueden identificarse fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, un ARNt retroviroico puede unirse a un sitio de unión a ARNt mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick y puede llevarse con el genoma del retrovirus en una partícula viral y utilizarse como un cebador para la síntesis de ADN por la transcriptasa inversa. En consecuencia, un sitio de unión a ARNt puede identificarse fácilmente basándose en su ubicación justo corriente abajo de una 5'LTR. El origen de síntesis del ADN de segunda cadena también se denomina el tracto de poli-purinas, situado justo corriente arriba de la 3'LTR.

15 En una realización, los vectores de lentivirus de la presente invención son vectores retroviroicos de autoinactivación (SIN). Se conocen en el área vectores y métodos de fabricación de dichos vectores retroviroicos SIN (véase, por ejemplo, Zufferey et al. (1998) 72: 9873-9880; Dull et al. (1998) *J. Virol.* 72: 8463-8471; Xu et al. (2001) *Molecular Therapy* 3: 1-8). En general, un vector SIN retroviroico puede construirse mediante la introducción de una supresión o una mutación en una secuencia reguladora transcripcional retroviroica de un vector retroviroico para generar un vector retroviroico SIN que es incompetente para la replicación e incapaz de transcribir un ARN de vector de longitud completa en células de mamíferos transducidas con dichos vectores.

25 En una realización preferida de la presente invención, el vector de lentivirus de la presente invención tiene una 3'LTR que contiene una supresión o mutación que inactiva la actividad transcripcional de esa 3'LTR ("SIN3'LTR") convirtiendo, de este modo, el vector en un vector SIN retroviroico. En esta realización, durante el procesamiento retroviroico y la transcripción inversa del ARN del vector de longitud completa, las secuencias de la 5'LTR se reemplazan con las secuencias de la SIN3'LTR.

30 La transcripción de un ARN del vector de longitud completa puede ser impulsada por un promotor en la 5'LTR de una secuencia de vector de lentivirus de la presente invención. Sin embargo, la ubicación del promotor no se limita a la 5'LTR y puede colocarse en cualquier ubicación en la que el promotor esté unido operativamente a la secuencia del vector respectivo. Como se usa en el presente documento "unido operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos de este modo están configurados de manera que realicen su función habitual o prevista. Por ejemplo, un promotor dado unido operativamente a una secuencia de genes, u otra secuencia que codifica una proteína, es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia. Sin embargo, el promotor no necesita estar contiguo a la secuencia de codificación, a condición de que funcione para dirigir la expresión de la secuencia unida operativamente.

40 La 5'LTR de una secuencia de vector de lentivirus de la presente invención puede modificarse mediante la sustitución de parte o de la totalidad de los elementos reguladores de la transcripción de la región U3 con potenciadores/promotores heterólogos. Dichos cambios pueden hacerse para potenciar la expresión de ARN de vector retroviroico en células productoras y estirpes celulares productoras; para permitir la producción del vector retroviroico en ausencia de un gen tat del VIH; y para eliminar una copia de tipo silvestre aguas arriba de una LTR del VIH que pueda recombinarse con la versión 3' suprimida para 'rescatar' un vector retroviroico SIN.

45 Por tanto, en algunas realizaciones, las secuencias de vector de lentivirus SIN de la presente invención tienen dichas alteraciones en la 5'LTR y pueden usarse, por ejemplo, en combinación con células de empaquetamiento que no expresan tat para generar células o estirpes celulares productoras.

50 Por ejemplo, la transcripción de la LTR del VIH depende de la función transactivadora de la proteína tat. En presencia de tat, que puede ser expresada por un vector de empaquetamiento, la transcripción de ARN de vector retroviroico de la LTR del VIH puede estimularse fuertemente. Cuando el ARN de vector retroviroico tiene un complemento completo de señales de empaquetamiento, el ARN se encapsida eficientemente en viriones infecciosos y puede transferirse eficientemente a las células diana. La cantidad de ARN de vector retroviroico disponible para el empaquetamiento por las células puede ser una etapa limitante de la velocidad en la producción de retrovirus recombinantes que llevan un ARN de vector retroviroico.

60 Las regiones del potenciador o del potenciador y el promotor de una 5'LTR pueden sustituirse, por ejemplo, con el potenciador o el potenciador y el promotor de un citomegalovirus humano (CMV) o un virus del sarcoma de Rous murino (RSV), respectivamente. Las regiones del potenciador o del potenciador y el promotor de una 5'LTR también pueden sustituirse, por ejemplo, con un promotor regulable tal como el promotor inducible por tetraciclina.

65 En una realización preferida, un vector de lentivirus de la presente invención tiene una bioseguridad significativamente mejorada en comparación con vectores retroviroicos conocidos porque no tiene ninguna copia de tipo silvestre de la LTR del VIH, ya sea en el extremo 5' o en el extremo 3', y se usa en conjunto con vectores de empaquetamiento tat-menos como se describen en el presente documento. Por tanto, en algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona vectores de empaquetamiento en los que las secuencias de tat se

suprimen funcionalmente (es decir, se inactiva la actividad y/o función de tat). Por ejemplo, el gen tat puede suprimirse, en parte o en su totalidad, o pueden hacerse diversas mutaciones puntuales u otras mutaciones a la secuencia tat para inactivar el gen.

5 Cuando un vector de lentivirus de la presente invención codifica un gen citotóxico (es decir, un gen que expresa un producto perjudicial para una célula hospedadora), un sistema promotor inducible preferentemente se une operativamente a la unidad de transcripción del gen citotóxico de manera que la expresión de ese gen pueda regularse para minimizar la toxicidad del hospedador cuando no se requiere la expresión génica.

10 Por ejemplo, el sistema de expresión génica regulable por tetraciclina de Gossen y Bujard (*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992) 89: 5547-5551) puede emplearse para proporcionar la expresión inducible de un gen cuando se retira la tetraciclina de la célula transferida. Por tanto, en una realización preferida, el transactivador tet/VP 16 está presente en un primer vector y una secuencia de codificación para un gen citotóxico se clona corriente abajo a partir de un promotor controlado mediante secuencias del operador tet en otro vector.

15 Además, un vector de lentivirus de la presente invención puede comprender una porción de unión a antígeno de un anticuerpo o una molécula de tipo anticuerpo recombinante, tal como un anticuerpo monocatenario, para dirigir el vector retrovítico a una diana celular específica. Los expertos en la materia conocerán o podrán determinar fácilmente sin experimentación innecesaria, métodos específicos para conseguir la entrega de un vector retrovítico a una diana celular específica.

20 Los métodos pueden comprender la transformación de una célula hospedadora con una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gag, un pol o genes gag y pol; y una segunda secuencia de nucleótidos que comprende una proteína de la envuelta heteróloga o funcionalmente modificada. Preferentemente, la proteína de la envuelta es una proteína de la envuelta de baculovirus, por ejemplo, gp64. Los elementos retrovíticos derivan de un lentivirus, por ejemplo, el VIH. Preferentemente, los vectores carecen de un gen tat funcional y/o de genes accesorios funcionales (vif, vpr, vpu, vpx, nef). Los métodos pueden comprender además la transformación de la célula hospedadora con una tercera secuencia de nucleótidos que comprende un gen rev. Opcionalmente, el método comprende, además, la transformación de la célula hospedadora con una secuencia de vector de transferencia que codifica un transgén unido operativamente a una secuencia de control de la expresión. La célula hospedadora puede cultivarse en condiciones adecuadas para la producción vírica y puede recuperarse del medio de cultivo ARN de vector de transferencia que lleva un retrovirus que codifica el transgén.

35 Las técnicas utilizadas para construir vectores y para transfectar e infectar las células, se ponen en práctica ampliamente en la técnica. Los profesionales están familiarizados con los recursos materiales convencionales que describen condiciones y procedimientos específicos. La construcción de los vectores de la presente invención emplea técnicas de ligadura y restricción convencionales que son bien conocidas en la técnica (véase Maniatis et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982). Los plásmidos aislados, las secuencias de ADN o los oligonucleótidos sintetizados se escinden, se adaptan y se vuelven a ligar en la forma deseada.

40 Pueden usarse métodos convencionales para preparar los virus utilizados en la invención (véase, por ejemplo, Burlison, et al., 1992, *Virology: A Laboratory Manual*, Academic Press, Inc., San Diego, California y Mahy, ed., 1985, *Virology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Reino Unido). Las condiciones convencionales para la propagación de los virus son adecuadas para permitir la expresión de una proteína de la envuelta de baculovirus en la superficie de una partícula de retrovirus.

50 Se describen métodos para la producción a gran escala de líneas de empaquetamiento de retrovirus seguras y eficaces para su uso en protocolos de inmunoterapia en Farson et al., 1999, *J. Gene Medicine* 1: 195-209. Se proporciona orientación adicional acerca de la producción y el uso de vectores de lentivirus en la Patente de los EE.UU. 6.165.782, publicada el 26 de diciembre de 2000 y en la Solicitud PCT N.º US 00/11097, publicada el 29 de noviembre de 2000. La eficiencia de la transducción puede potenciarse y la toxicidad puede minimizarse o eliminarse a través de la selección de elementos para la construcción del vector, así como a través de la purificación o la concentración del vector. Dichos métodos de purificación y de concentración son bien conocidos en la técnica.

55 Se prefiere el uso de vectores de lentivirus de la presente invención que sean capaces de una alta infectividad (por ejemplo, más del 20 % de las células diana que expresan transgenes, preferentemente más del 25 % de las células diana que expresan o una infectividad de al menos aproximadamente 5×10^7 TU/ μ g de antígeno de Gag p24) de células en reposo así como proliferantes. También se prefiere el uso de un protocolo de purificación suficiente para producir una solución madre vírica que esté sustancialmente libre de contaminantes no infecciosos. El lentivirus de la presente invención puede centrifugarse a baja velocidad, filtrarse y después concentrarse por centrifugación a alta velocidad, tal como a aproximadamente 19.500 rpm.

65 El retrovirus puede tener un título de 5×10^4 unidades infecciosas/ml. Preferentemente, el retrovirus tiene al menos un título de 1×10^5 , o más preferentemente, al menos de 5×10^5 unidades infecciosas/ml y, mucho más preferentemente, al menos 5×10^6 unidades infecciosas/ml. El título puede determinarse mediante un ensayo de

infectividad conocido o convencional en una diversidad de células, por ejemplo, 293T, HeLa o células de hepatoma HUH7.

Transferencia génica mediada por retrovirus

5 La presente divulgación proporciona adicionalmente métodos para la entrega de un transgén a una célula, *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo* usando el retrovirus. También se proporcionan por la invención métodos de tratamiento de un sujeto y de entrega de un transgén terapéutico a células de un sujeto usando el retrovirus. El transgén puede entregarse a células en división o en reposo en un sujeto, tales como las células del hígado. El método comprende el uso de los
10 vectores de transferencia retrovíricos de la presente invención para transducir una célula con una secuencia que codifica un transgén. Preferentemente, el transgén es un transgén terapéutico. Preferentemente no se provoca ninguna toxicidad significativa en el sujeto. La toxicidad puede minimizarse o eliminarse mediante el uso de un vector de la invención, tal como los que se describen en el presente documento y que tienen una infectividad de al menos aproximadamente 5×10^7 TU/ μg de antígeno p24^{Gag}.

15 Las partículas retrovíricas de la invención pueden administrarse a un sujeto por vía parenteral, preferentemente por vía intravascular (incluyendo la intravenosa). Cuando se administra por vía parenteral, se prefiere que las partículas del vector de la presente invención se administren en un vehículo farmacéutico adecuado para la inyección tal como una solución o dispersión acuosa estéril. Después de la administración, el sujeto es controlado para detectar
20 cambios en la expresión génica. La dosis y la duración del tratamiento se determinan individualmente dependiendo de la afección o enfermedad que se trate. Puede tratarse una amplia diversidad de afecciones o enfermedades basándose en la expresión génica producida por la administración del gen de interés en el vector de la presente invención.

25 La dosificación del vector retrovírico entregado usando los métodos variará en función de la respuesta deseada por el hospedador y el vector utilizados. En general, se espera que puedan administrarse hasta 100-200 μg de ADN o ARN en una sola dosis, aunque un intervalo de 0,5 mg/kg de peso corporal a 50 mg/kg de peso será adecuado para la mayor parte de las aplicaciones.

30 El pseudotipado puede extender el tropismo tisular de los vectores retrovíricos de la presente invención y puede aumentar la eficiencia de la transferencia génica al interior de las células. En consecuencia, la presente divulgación proporciona adicionalmente métodos de entrega de un transgén a una célula usando vectores retrovíricos pseudotipados.

35 En realizaciones preferidas, el transgén es un transgén terapéutico. Sin embargo, las composiciones y métodos de la presente divulgación pueden usarse para producir cualquier secuencia de vector no retrovírico, o productos de expresión de la misma, en células específicamente con el propósito de la reproducción de esa secuencia (por ejemplo, para la clonación) o producto de expresión (por ejemplo, para su uso terapéutico o comercial). De este modo, los retrovirus recombinantes pueden actuar como un vehículo de clonación y tienen utilidad como tales para
40 la reproducción de cualquier secuencia transgénica que pueda empaquetarse en retrovirus recombinantes de la presente invención para la infección y la transducción de una célula de manera que la célula exprese la secuencia transgénica. El retrovirus recombinante puede usarse para el tratamiento de enfermedades en un sujeto en el que exista una expresión defectuosa o deficiente de productos génicos, una infección vírica, un tumor o un cáncer.

45 La "transferencia génica" o "entrega de genes", como se usa en el presente documento en referencia a la introducción o la entrega de una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN) de interés en una célula hospedadora (por ejemplo, una célula diana, una célula de empaquetamiento o una célula productora), da como resultado: 1) la expresión transitoria de ADN transferido no integrado; 2) la replicación extracromosómica y la expresión de replicones transferidos (por ejemplo, episomas); o 3) la integración del material
50 genético transferido en el ADN genómico de las células hospedadoras.

La transferencia de genes mediada por retrovirus, basada en la transducción *ex vivo* de las células diana, es conocida y, por ejemplo, ha sido empleada en humanos. La posibilidad de la entrega dirigida y la expresión de genes o secuencias de ácidos nucleicos seleccionados en células del tejido deseable en un entorno *in vivo* usando
55 vectores retrovíricos también se conoce. Por tanto, la transferencia génica mediada por retrovirus usando las composiciones puede usarse para tratar eficazmente trastornos genéticos, tumores e infecciones víricas en un sujeto. Los trastornos genéticos incluyen, por ejemplo, enfermedades que dan como resultado lesiones en genes. Dichas enfermedades pueden incluir, por ejemplo, trastornos hematopoyéticos y de la médula ósea, trastornos metabólicos que dan como resultado defectos en las enzimas hepáticas y enfermedades del sistema nervioso central. Las posibles aplicaciones clínicas son, por tanto, numerosas para dicha transferencia génica mediada por
60 retrovirus usando las composiciones.

Para algunas enfermedades, la introducción de un homólogo funcional del gen defectuoso y la producción de incluso pequeñas cantidades del producto génico podrían tener un efecto beneficioso. Otras enfermedades pueden requerir
65 que se produzca una cantidad específica de producto génico en un momento específico, normalmente en respuesta a una señal fisiológica (expresión génica regulada). Un ejemplo de dichas enfermedades es la diabetes, en la que la

producción de insulina requiere dicha expresión de genes regulada. En dichos casos se indicaría la sustitución génica, en lugar del aumento génico que se encuentra actualmente en práctica. De lo contrario puede intentarse corregir el defecto genético subyacente mediante el uso de genes junto con sus interruptores reguladores nativos (aumento génico). En otros casos, en los que no es necesario corregir la lesión genética en el tipo de célula que presenta el defecto, el gen puede introducirse en un tipo de célula diferente. Esto es generalmente cierto para genes que codifican ya sea proteínas secretoras o enzimas que catalizan la producción de productos de secreción. Un ejemplo es el caso de la enfermedad de Parkinson donde se implantaron por vía intracerebral en ratas fibroblastos transducidos retrovéricamente que codifican tirosina hidroxilasa y son capaces de fabricar dopamina. Véase Wolff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 9011-15 (1989). Sin embargo, la mayoría de las enfermedades genéticas requieren que el gen defectuoso se reemplace en el tipo de célula pertinente.

Debido a que los tumores malignos parecen ser el resultado de varias de lesiones genéticas, tanto heredadas como adquiridas, que parecen activar oncogenes y/o inactivar genes supresores de tumores, las aplicaciones de terapia génica para tratar tumores puede tomar varios enfoques. Una estrategia es potenciar los efectos citotóxicos de los mecanismos de defensa naturales del cuerpo contra las células tumorales, por ejemplo usando linfocitos infiltrantes de tumores mediante la expresión de ciertos productos génicos (véase, por ejemplo, Kasid, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87: 473-77 (1990); Rosenberg, *Cancer Res. Sup.* 51: 50745-50795 (1991); Rosenberg, *J. Am. Med. Assn.* 268: 2614- 19 (1992); Anderson, *Science* 256: 808-13 (1992)). Un segundo enfoque se dirige hacia la inhibición de la actividad de los oncogenes de actuación dominante (véase, por ejemplo, Tubiana, *Eur. J. Cancer* 27: 936-39 (1991)). Otra estrategia implica la entrega dirigida en las células tumorales de los genes que codifican productos tóxicos o genes que confieren sensibilidad a los fármacos tóxicos, por ejemplo, el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) (véase, por ejemplo, Moolten y Wells, *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 297-300 (1990) y Culver, *Science* 256: 1550-1552 (1992)). Los vectores retrovéricos que transducen el gen HSV-tk en células tumorales pueden potenciar la incorporación de análogos de nucleósidos tales como el aciclovir y el ganciclovir y, por tanto, presentar efecto tumoricida tras la administración de estos fármacos.

La terapia génica también encuentra utilidad en el tratamiento de afecciones inducidas por virus, tales como las infecciones por VIH y HTLV-I. Las proteínas reguladoras o los elementos de respuesta de VIH y HTLV-I necesarios para la producción de virus son posibles dianas. Podrían introducirse mutantes de estas proteínas para competir con las proteínas víricas nativas. Además, se están empleando ARN no codificantes complementarios a los ARN retrovéricos para inhibir específicamente la replicación del VIH y el HTLV-I (véase, por ejemplo, Rodas y James, *AIDS* 5: 145-51 (1991); von Rueden y Gilboa, *J. Virol.* 63: 677-82 (1989)). Los vectores retrovéricos que llevan secuencias no codificantes o ribozimas específicas del VIH podrían usarse para inhibir la expresión del VIH para la inmunización celular. Los complejos de ARN tricatenario, en los que el ARN bicatenario está bloqueado en su conformación por una tercera cadena podrían resultar ser una manera eficaz de silenciar la expresión de genes víricos mediante el diseño de vectores retrovéricos que codifiquen un ARN no codificante y uno tricatenario antiparalelo en una sola molécula de un vector retrovérico (véase, por ejemplo, Giovannangeli, *J. Am. Chem. Soc.* 113: 7775- 77 (1991)).

En general, los vectores retrovéricos ofrecen ventajas sobre otros vehículos de transferencia de genes víricos y sobre otros métodos de transferencia génica, incluyendo, para sistemas de mamíferos, la electroporación, la precipitación de CaPO₄, DEAE-dextrano, la inyección directa de ADN y la lipofección. Los retrovirus llevan información genética en forma de ARN, transcribiendo de forma inversa una forma de ADN tras la infección que se integra eficientemente en el ADN genómico de la célula infectada y, de este modo, ofrecen una propagación estable de la secuencia integrada en las células de la progenie de la célula parental transducida. La integración retrovérica es específica de sitio con respecto a los extremos víricos y el provirus, por lo general, está intacto y es colineal con el genoma vírico, es decir, el orden de los genes LTR-gag-pol-env-LTR es mantenido por el provirus que, en consecuencia, reduce la posibilidad de reordenamientos del ADN y/o supresiones, como se observa habitualmente con la integración de la vía al azar. Las células infectadas con vectores retrovéricos de replicación defectuosa no expresan proteínas víricas y por tanto no son susceptibles al aclaramiento inmunitario. Además, la eficiencia de la transferencia génica y de la expresión estable en células transducidas puede ser muy alta con dichos vectores. Por estas razones dichos vectores retrovéricos han sido aprobados para su uso en la terapia génica humana.

Aunque las pautas terapéuticas *ex vivo* han encontrado éxito en el tratamiento de ciertos trastornos genéticos, otros trastornos necesitan ser tratados usando un enfoque terapéutico *in vivo* debido a que el trastorno genético afecta a tipos celulares no aislados fácilmente. Por tanto, preferentemente, el vector retrovérico empaquetado no se inactiva por respuestas inmunitarias específicas humorales o celulares del hospedador o por respuestas no específicas tales como el complemento u otros factores sanguíneos. En dichas aplicaciones, también es preferible que el vector retrovérico infecte solo las células en las que se manifiesta el defecto. En una realización preferida, la expresión del gen terapéutico es controlada por elementos reguladores que dirigen la expresión al tipo celular pertinente.

Los retrovirus pueden clasificarse de acuerdo con su gama de hospedadores. Por ejemplo, los retrovirus murinos ecotrópicos tales como MuLV (MuLV-E) infectan solo células murinas. Los retrovirus murinos xenotrópicos tales como MuLV (MuLV-X) infectan células no murinas. Los retrovirus murinos anfotrópicos tales como MuLV (MuLV-A) infectan tanto células murinas como no murinas, incluyendo células humanas. Como se describe en el presente documento, la gama de hospedadores y el tropismo celular son determinados principalmente por la proteína de la

envuelta vírica y la disponibilidad de proteínas receptoras específicas en las células hospedadoras. Por tanto, usando las composiciones y métodos, la gama de hospedadores de un retrovirus puede alterarse mediante pseudotipado.

- 5 Otros enfoques para la modificación de la capacidad de infección de tejido de los vectores retrovíricos para conseguir la dirección vírica implican el uso de anticuerpos unidos a estreptavidina bivalentes. Otros enfoques implican la generación de proteínas de la envuelta modificadas funcionalmente por fusión o acoplamiento químico de ligandos o proteínas que se unen a dianas celulares específicas para una proteína de envuelta. Por ejemplo, un enfoque implica la fusión o el acoplamiento químico de un ligando (por ejemplo, un receptor o anticuerpo) con una
10 proteína de la envuelta. Por ejemplo, mediante el acoplamiento de la proteína de la envuelta con lactosa, la proteína se convierte en una asialoglucoproteína artificial que es internalizada por receptores específicos en los hepatocitos (véase, por ejemplo, Neda, *J. Biol. Chem.* 226: 14143-46 (1991)). Un enfoque adicional implica la mutación de la región de reconocimiento del receptor del gen de la envuelta para generar proteínas quiméricas de la envuelta. Por ejemplo, un vector MoMuLV-E diseñado por ingeniería genética lleva una proteína eritropoyetina-envuelta quimérica
15 (EPO-envuelta) sobre su superficie ha presentado infectividad para células que llevan el receptor de EPO, tanto de origen murino como humano (véase, por ejemplo, Kasahara, *Science* 266: 1373-1376 (1994)). Esta construcción quimérica tiene una secuencia de codificación de EPO sustituida por la región N-terminal del gen de la envuelta, y, aunque la construcción MoMuLV-E quimérica presenta dirección a tejido, se requiere la complementación de la proteína de envuelta de tipo silvestre.

20 **Secuencias transgénicas**

Las secuencias de vector de transferencia de lentivirus de la presente invención pueden codificar una o más
25 secuencias transgénicas (es decir, un gen o fragmento de gen, o más de un gen o fragmento de gen u otra secuencia que codifica una proteína). Cualquiera de las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento puede usarse para identificar fragmentos o secuencias codificantes de longitud completa de los genes a los que se asocian y puede ser adecuada para su uso en las composiciones y métodos de la presente invención. Los métodos de aislamiento de fragmentos o secuencias de longitud completa de genes son bien conocidos en la
30 técnica.

Dichos genes y/o fragmentos de genes pueden comprender cualquier secuencia útil en terapia génica o para cualquier otro propósito (por ejemplo, la clonación o la producción de producto). Véase, por ejemplo los documentos WO96/21014 y WO91/02805 para una descripción de secuencias de ácidos nucleicos de interés terapéutico que
35 pueden introducirse en los vectores de lentivirus de la invención. Preferentemente, la secuencia transgénica codifica una proteína, por ejemplo, una hormona, enzima, receptor o anticuerpo monocatenario, útil en terapia génica.

La secuencia transgénica puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos de interés que pueda transcribirse. En general, la secuencia transgénica codifica un polipéptido. Preferentemente, el polipéptido tiene algún beneficio terapéutico. Por ejemplo, el polipéptido puede complementar la expresión deficiente o inexistente de una proteína
40 endógena en una célula hospedadora. El polipéptido puede conferir nuevas propiedades de la célula hospedadora, tales como un receptor de señalización quimérico, véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.359.046. El experto puede determinar la idoneidad de una secuencia transgénica poniendo en práctica técnicas que se enseñan en el presente documento y son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el experto sabría si una secuencia transgénica es de un tamaño adecuado para la encapsidación y si el producto de secuencia transgénica se expresa correctamente.

Preferentemente, una secuencia transgénica codificada por una secuencia de vector de lentivirus de la presente invención está unida operativamente a un promotor que es interno a las secuencias reguladoras de la transcripción de la secuencia del vector retrovírico. "Unida operativamente" como se usa en el presente documento con referencia
50 a una secuencia transgénica se refiere a un enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácidos nucleicos transgénica que da como resultado la expresión de la secuencia transgénica en las células.

Puede ser deseable modular la expresión de una molécula de regulación génica en una célula mediante la introducción de una molécula usando las composiciones y métodos. El término "modular" prevé la supresión de la
55 expresión de un gen cuando se sobreexpresa o el aumento de la expresión cuando se subexpresa. Cuando un trastorno proliferativo celular se asocia a la expresión de un gen, pueden usarse secuencias de ácidos nucleicos que interfieran con la expresión de un gen en el nivel traduccional. El enfoque puede usar, por ejemplo, ácido nucleico no codificante, ribozimas o agentes tricatenarios para bloquear la transcripción o traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando el ARN con un ácido nucleico no codificante o un agente tricatenario o mediante la escisión del mismo con una ribozima.
60

Los ácidos nucleicos no codificantes son moléculas de ADN o ARN que son complementarias con al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub, *Sci. Am.* (1990) 262:40). En la célula, los ácidos nucleicos no codificantes se hibridan con el ARNm correspondiente formando una molécula bicatenaria. Los ácidos nucleicos
65 no codificantes interfieren con la traducción del ARNm ya que la célula no traducirá un ARNm que sea bicatenario. Se prefieren los oligómeros no codificante de aproximadamente 15 nucleótidos o más ya que los mismos se

sintetizan fácilmente y son menos propensos a provocar problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en la célula diana. El uso de métodos no codificantes para inhibir la traducción *in vitro* de genes es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Marcus-Sakura, *Anal. Biochem.* (1988) 172: 289).

5 Los ácidos nucleicos no codificantes útiles también incluyen moléculas de ARN de interferencia pequeño (ARNip). Los métodos de uso de ARNip para inhibir la expresión de genes son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.506.559).

10 El ácido nucleico no codificante puede usarse para bloquear la expresión de una proteína mutante o de un producto génico predominantemente activo, tal como la proteína precursora de amiloide que se acumula en la enfermedad de Alzheimer. Dichos métodos también son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, el Parkinson hereditario y otras enfermedades. Los ácidos nucleicos no codificantes también son útiles para la inhibición de la expresión de proteínas asociadas a toxicidad.

15 El uso de un oligonucleótido para detener la transcripción puede ser mediante el mecanismo conocido como la estrategia tricatenaria ya que el oligómero se enrolla alrededor del ADN de doble hélice, formando una hélice tricatenaria. Por tanto, los compuestos tricatenarios pueden diseñarse para reconocer un único sitio en un gen elegido (véase, por ejemplo, Maher et al., *Antisense Res. y Dev.* (1991) 1 (3): 227; Helene, *Anticancer Drug Dis.* (1991) 6 (6): 569).

20 Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otro ARN monocatenario de una forma análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. A través de la modificación de secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN, es posible diseñar moléculas que reconozcan y rompan secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN (véase, por ejemplo, Cech, *J. Amer. Med Assn.* (1988) 260: 3030). Una ventaja importante de este enfoque es que solo son inactivados los ARNm con secuencias particulares.

30 La secuencia o secuencias transgénicas deseadas son secuencias preferentemente no retrovíricas que se insertan en una secuencia de vector de transferencia de lentivirus de la presente invención. Sin embargo, en algunos casos, un gen terapéutico deseado puede ser un gen retrovírico, por ejemplo, una secuencia que codifica una proteína estructural del VIH capaz de inducir una respuesta inmunitaria anti-VIH. Dichas secuencias terapéuticas retrovíricas son preferentemente recombinantes o heterólogas con respecto a la secuencia del vector retrovírico (por ejemplo, una secuencia génica terapéutica de VIH-1 se inserta en una secuencia del vector MuLV de la presente invención).

35 Por ejemplo, para potenciar los mecanismos de defensa citotóxicos naturales del cuerpo, los vectores de lentivirus recombinantes de la invención pueden incluir secuencias que estimulen la producción de, o que modifiquen genéticamente, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL, del inglés *tumor infiltrating lymphocytes*). Se han empleado TIL transducidos *ex vivo* con un vector retrovírico que expresa el gen neo para estudiar sus sitios de migración dirigida en los hospedadores humanos. Del mismo modo, se han utilizado TIL transducidos con el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumor necrosis factor*) para el tratamiento de sujetos humanos con melanoma avanzado. Además, los TIL transducidos con receptor quimérico de linfocitos T (TcR) que consiste en la región constante del TcR y la región variable de un anticuerpo monoclonal puede ser redirigido para lisar las células cancerosas reconocidas por el anticuerpo monoclonal.

45 La secuencia de ácidos nucleicos insertada en el vector de lentivirus puede ser, por ejemplo, un gen estructural vírico que sea capaz de inducir una respuesta inmunitaria contra una infección vírica en un sujeto. Adicionalmente, la secuencia de ácidos nucleicos insertada en el vector retrovírico puede ser, por ejemplo, cualquier otro gen útil para la vacunación o la inmunización de un sujeto (por ejemplo, una bacteria o protozoo, en particular un patógeno o un gen que codifique un antígeno tumoral). En el caso particular de una enfermedad provocada por la infección por VIH, donde se desea la inmunoestimulación, el antígeno generado a partir de un retrovirus recombinante puede estar en una forma que desencadenará una respuesta inmunitaria restringida a HLA de clase I o de clase II. En el caso del antígeno de la envuelta del VIH, por ejemplo, el antígeno se selecciona preferentemente entre gp 160, gp 120 y gp 41, que se han modificado para reducir su patogenicidad. En particular, el antígeno seleccionado se modifica para reducir la posibilidad de sincitios, para evitar la expresión de epítomos que conduzcan a una enfermedad que potencie la respuesta inmunitaria, para eliminar epítomos inmunodominantes pero específicos de haplotipo o para presentar varios epítomos específicos de haplotipo y permitir una respuesta capaz de eliminar las células infectadas con la mayoría o todas las cepas de VIH.

60 Los epítomos de específicos de haplotipo pueden seleccionarse adicionalmente para promover la estimulación de una respuesta inmunitaria dentro de un animal que tenga reactividad cruzada contra otras cepas de VIH. Los antígenos de otros genes del VIH o combinaciones de genes, tales como gag, pol, rev, vif, nef, prot, gag/pol, gag prot, etc., también pueden proporcionar protección en casos particulares. El VIH es solamente un ejemplo. Este enfoque debería ser eficaz contra muchas enfermedades o cánceres vinculados víricamente donde se exprese un antígeno característico (que no es necesario que sea una proteína de membrana), tal como en el VPH y el carcinoma cervical, las leucemias inducidas por HTLV-I, el antígeno específico prostático (PSA, del inglés *prostate-specific antigen*) y el cáncer de próstata, el p53 mutado y el carcinoma de colon y el melanoma, los antígenos

específicos de melanoma (MAGE, del inglés *melanoma specific antigens*) y el melanoma, la mucina y el cáncer de mama.

5 Puede insertarse Una diversidad de citocinas o genes inmunomoduladores en los vectores de lentivirus de la invención. Los ejemplos representativos de factores inmunomoduladores incluyen citocinas, tales como IL-1, IL-2 (véase, por ejemplo, Karupiah et al., *J. Immunology* 144: 290-298,1990; Weber et al., *J. Exp. Med.* 166: 1716-1733, 1987; Gansbacher et al., *J. Exp. Med.* 172: 1217-1224, 1990; la Patente de los EE.UU. N.º 4.738.927), IL-3, IL-4 (véase, por ejemplo, Tepper et al., *Cell* 57: 503-512, 1989; Golumbek et al., *Science* 254: 713-716, 1991; la Patente de los EE.UU. N.º 5.017.691), IL-5, IL-6 (véase, por ejemplo, Brakenhof et al., *J. Immunol.* 139: 4116-4121, 1987; el documento WO 90/06370), IL-7 (véase, por ejemplo, la la Patente de los EE.UU. N.º 4.965.195), IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13 (véase, por ejemplo, *Cytokine Bulletin*, Verano de 1994), IL-14 e IL-15, en particular IL2, IL-4, IL-6, IL-12, e IL-13, interferón alfa (véase, por ejemplo, Finter et al., *Drugs* 42(5): 749-765, 1991; la Patente de los EE.UU. N.º 4.892.743; la Patente de los EE.UU. N.º 4.966.843; el documento WO 85/02862; Nagata et al., *Nature* 284: 316-320, 1980; Familletti et al., *Methods in Enz.* 78: 387-394,1981; Twu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2046-2050,1989; Faktor et al., *Oncogene* 5: 867-872,1990), interferón beta (véase, por ejemplo, Seif et al., *J. Virol.* 65: 664-671, 1991), interferones gamma (véase, por ejemplo, Radford et al., *The American Society of Hepatology* 2008-2015, 1991; Watanabe et al., *PNAS* 86: 9456-9460,1989; Gansbacher et al., *Cancer Research* 50: 7820-7825,1990; Maio et al., *Can. Immunol. Immunother.* 30: 34-42, 1989; la Patente de los EE.UU. N.º 4.762.791; la Patente de los EE.UU. N.º 4.727.138), G-CSF (factor estimulante de colonias granulocíticas) (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 4.999.291 y 4.810.643), GM-CSF (factor estimulante de colonias granulomonocíticas) (documento WO 85/04188), factores de necrosis tumoral (TNF) (véase, por ejemplo, Jayaraman et al., *J. Immunology* 144: 942-951, 1990), CD3 (véase, por ejemplo, Krissanen et al., *Immunogenetics* 26: 258-266,1987), ICAM-1 (véase, por ejemplo, Altman et al., *Nature* 338: 512-514,1989; Simmons et al., *Nature* 331: 624-627, 1988), ICAM-2, LFA-1, LFA-3 (véase, por ejemplo, Wallner et al., *J. Exp. Med.* 166(4): 923-932, 1987), moléculas del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase I, moléculas del CMH de clase II, B7.1- 3, b. sub. 2-microglobulina (véase, por ejemplo, Parnes et al, *PNAS* 78: 2253-2257, 1981), chaperonas tales como calnexina, proteínas transportadoras unidas al CMH o análogos de las mismas (véase, por ejemplo, Powis et al., *Nature* 354: 528-531, 1991). Los factores inmunomoduladores también pueden ser agonistas, antagonistas o ligandos para estas moléculas. Por ejemplo las formas solubles de los receptores con frecuencia pueden comportarse como antagonistas para estos tipos de factores, igual que pueden hacerlo las formas mutadas de los mismos factores.

En una realización, el gen codifica interferón gamma. Los factores inmunomoduladores también pueden ser agonistas, antagonistas o ligandos para estas moléculas. Por ejemplo las formas solubles de los receptores con frecuencia pueden comportarse como antagonistas para estos tipos de factores, igual que pueden hacerlo las formas mutadas de los mismos factores. Los genes que codifican cualquiera de las citocinas y proteínas inmunomoduladoras descritas en la presente memoria descriptiva pueden expresarse en un vector retroviral para conseguir una expresión *in vivo* a largo plazo. También pueden usarse otras formas de estas citocinas que son conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican IL-2 e interferón gamma pueden obtenerse como se describe en las Patentes de los EE.UU. N.º 4.738.927 y 5.326.859, respectivamente, mientras que las muteinas útiles de estas proteínas pueden obtenerse como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 4.853.332. Como ejemplo adicional, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las formas corta y larga del M-CSF pueden obtenerse como se describe en las Patentes de los EE.UU. N.º 4.847.201 y 4.879.227, respectivamente. Los vectores retrovirales que expresan citocinas o genes inmunomoduladores pueden producirse como se describe en el presente documento y en la publicación PCT número N.º de Serie de los EE.UU. 94/02951 titulada "*Compositions and Methods for Cancer Immunotherapy*".

Una diversidad de diferentes formas de polipéptidos del factor de crecimiento IGF-1 y IGF-2 también es bien conocida en la técnica y puede incorporarse en los vectores retrovirales para la expresión *in vivo* a largo plazo. Véase por ejemplo la Patente Europea N.º 0123228B1, concesión publicada el 19 de septiembre de 1993, titulada "*Hybrid DNA Synthesis of Mature Insulin-like Growth Factors*". Como ejemplo adicional, la expresión *in vivo* a largo plazo de diferentes formas del factor de crecimiento de fibroblastos también puede efectuarse mediante los métodos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.464.774, concedida el 7 de noviembre de 1995, la Patente de los EE.UU. N.º 5.155.214 y la Patente de los EE.UU. N.º 4.994.559, para una descripción de los diferentes factores de crecimiento de fibroblastos.

Como ejemplos adicionales, el Factor VIII o el Factor IX son útiles para el tratamiento de trastornos de la coagulación sanguínea, tales como la hemofilia. Las diferentes formas del Factor VIII, tales como la construcción de Factor VIII con dominio B suprimido descrita en el documento WO 96/21014, pueden usarse para producir vectores retroviral que expresen Factor VIII para su uso en los métodos. Además de los factores de coagulación, existen varias proteínas que pueden expresarse en los vectores de lentivirus de la invención y que son útiles para el tratamiento de enfermedades hereditarias. Estos incluyen la lactasa para el tratamiento de la intolerancia a la lactosa hereditaria, la AD para el tratamiento de la deficiencia de ADA y la alfa-1 antitripsina para el tratamiento de la deficiencia de alfa-1 antitripsina (véase, por ejemplo, F.D. Ledley, *J. Pediatrics*, 110, 157-174 (1987); I. Verma, *Scientific American* (noviembre, 1987) págs. 68-84; y la publicación PCT WO 9527512 titulada "*Gene Therapy Treatment for a Variety of Diseases and Disorders*" para una descripción del tratamiento de terapia génica de las enfermedades genéticas).

Como alternativa, los vectores de lentivirus recombinantes de la invención pueden incluir genes inducibles que codifican productos tóxicos o genes que confieren sensibilidad a un fármaco tóxico (enfoque vector suicida). Un ejemplo de un gen que codifica un producto tóxico es el gen de la toxina diftérica. Un ejemplo de un gen que confiere sensibilidad a un fármaco tóxico es el gen TK del virus del herpes simple, que potencia la capacidad de las células para metabolizar e incorporar análogos nucleosídicos tales como aciclovir y ganciclovir. También puede usarse una diversidad de otras enzimas de conversión de profármacos en los vectores de lentivirus de la invención (véase, por ejemplo, el documento WO 95/14091 y el documento EP 0 415 731 para una descripción de la timidina cinasa vírica y otros sistemas de conversión de profármacos para su uso en los vectores retrovíricos de la invención).

Los vectores de lentivirus recombinantes de la invención pueden incluir secuencias, genes y/o fragmentos de genes que codifiquen ya sea formas de tipo silvestre o mutantes de las proteínas reguladoras o elementos de respuesta de VIH o HTLV-I que son necesarios para la producción de virus (por ejemplo, las proteínas gag y rev proteínas y la secuencia TAR del VIH). Estas secuencias pueden modificarse mediante la adición, sustitución o supresión de nucleótidos para cambiar el marco de lectura de la proteína o por truncamiento del extremo N o C o supresión de una secuencia interna de nucleótidos para proporcionar como resultado la expresión de una proteína o elemento de respuesta de VIH o HTLV-I defectuosa, dominante trans o competitiva. La entrega de los vectores retrovíricos recombinantes de la invención que llevan estas secuencias mutantes de tipo salvaje, defectuosas o de acción dominante trans "armaría" las células transducidas con proteínas "señuelo" ya sea para inhibir directamente la replicación del virus infectante o para provocar la incompetencia de replicación y la infección abortiva por las partículas viriónicas empaquetadas.

Como alternativa, los vectores de lentivirus recombinantes de la invención pueden incluir secuencias que codifican ARN no codificante o ribozima contra VIH o HTLV-I que inhiben específicamente la replicación del virus y, por tanto, encontrarían un uso en terapéutica y probablemente en los tratamientos profilácticos para la infección por VIH o HTLV-I.

Los vectores de transferencia de lentivirus de la presente invención pueden incluir secuencias, genes y/o fragmentos de genes para el tratamiento de enfermedades genéticas que son resultado de la expresión del producto o productos génicos defectuosos tales como la inmunodeficiencia combinada grave, la granulomatosis crónica, la enfermedad de Gaucher, la anemia de células falciformes, las talasemias α y β , el síndrome de Lesch-Nyhan, la distrofia muscular de Duchenne, la enfermedad de Parkinson, el enfisema, la fibrosis quística, la fenilcetonuria, la hipercolesterolemia familiar o la hemofilia A y B. Dichas enfermedades se caracterizan por una deficiencia de un producto génico específico que afecta a un tipo celular específico.

Por ejemplo, la granulomatosis crónica se caracteriza por una deficiencia en el citocromo b que afecta a los neutrófilos; la distrofia muscular de Duchenne se caracteriza por una deficiencia en la distrofina que afecta a las células musculares; la hipercolesterolemia familiar se caracteriza por una deficiencia en la lipoproteína de baja densidad que afecta a los hepatocitos; la enfermedad de Gaucher se caracteriza por una deficiencia en la glucocerebrosidasa que afecta a los macrófagos; la hemofilia A y B se caracterizan por una deficiencia en los factores VIII y IX, que afecta a las células endoteliales; el síndrome de hipoxantina de Lesch-Nyhan se caracteriza por una deficiencia en la fosforribosil transferasa que afecta a los ganglios basales; la enfermedad de Parkinson se caracteriza por una deficiencia en la dopamina que afecta a la sustancia negra; la fenilcetonuria se caracteriza por una deficiencia en la fenilalanina hidroxilasa que afecta a los hepatocitos; la inmunodeficiencia combinada grave se caracteriza por una deficiencia en la adenosina desaminasa que afecta a los linfocitos T y B; la anemia de células falciformes se caracteriza por una deficiencia en la β -globina que afecta a los eritrocitos; y las talasemias α y β se caracterizan por una deficiencia en la α y β -globina que afecta a los eritrocitos.

Dentro de los vectores de lentivirus recombinantes de la invención, las secuencias, los genes y/o los fragmentos de genes deseados pueden insertarse en varios sitios (por ejemplo, en un sitio o polienlazador de enzima de restricción) y pueden unirse operativamente a diferentes secuencias reguladoras. Por ejemplo, un sitio para la inserción puede ser el sitio proximal del potenciador/promotor vírico (es decir, el locus del gen impulsado por la 5'LTR). Como alternativa, las secuencias deseadas pueden insertarse en el sitio distal del promotor vírico, cuando la expresión de la secuencia o secuencias deseadas sea a través de corte y empalme del cistrón proximal promotor, un promotor heterólogo interno como SV40 o CMV o un sitio de entrada interno de ribosoma (IRES, del inglés *internal ribosome entry site*).

Los vectores de lentivirus de la invención pueden incluir adicionalmente una secuencia o secuencias marcadoras o un gen o genes marcadores que codifican una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que proporcionan una etiqueta molecular en las células transducidas para permitir su aislamiento mediante la selección positiva o mediante dispositivos de clasificación celular. Los ejemplos de resistencia a antibióticos incluyen el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa que está codificado por neo (aph) y confiere resistencia a la neomicina o G418 (véase, por ejemplo, *Southern, J. Moi. Appl. Gen.* 1: 327 (1982)) y el gen de la higromicina-B-fosfotransferasa que está codificada por hyg (hph) y confiere resistencia a la higromicina-B (véase, por ejemplo, Gritz, *Gene* 25: 179 (1983); Sugden, *Mol. Cell. Biol.* 5: 410 (1985); Palmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1055 (1987)). Los marcadores moleculares de ejemplo incluyen proteínas de tipo CD8 quiméricas o de tipo silvestre y las secuencias de nucleótidos que codifican dichas proteínas.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las sustancias descritas anteriormente, así como otras moléculas de ácido nucleico que son ventajosos para su uso dentro de la presente invención, pueden obtenerse fácilmente a partir de una diversidad de fuentes, incluyendo por ejemplo depositarios tales como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) o de fuentes comerciales tales como British BioTechnology Limited (Cowley, Oxford
 5 Inglaterra). Los ejemplos representativos incluyen BBG 12 (que contiene el gen de GM-CSF que codifica para la proteína madura de 127 aminoácidos), BBG 6 (que contiene secuencias que codifican interferón gamma), N.º de ATCC 39656 (que contiene secuencias que codifican interferón TNF), N.º de ATCC 20663 (que contiene secuencias que codifican interferón alfa), N.º de ATCC 31902, 31902 y 39517 (que contienen secuencias que codifican interferón beta), N.º de ATCC 67024 (que contiene una secuencia que codifica interleucina-1b), N.º de ATCC 39405, 39452,
 10 39516, 39626 y 39673 (que contienen secuencias que codifican interleucina-2), N.º de ATCC 59399, 59398 y 67326 (que contienen secuencias que codifican interleucina-3), N.º de ATCC 57592 (que contiene secuencias que codifican interleucina-4), N.º de ATCC 59394 y 59395 (que contienen secuencias que codifican interleucina 5) y N.º de ATCC 67153 (que contiene secuencias que codifican interleucina-6).

15 Como alternativa, pueden obtenerse secuencias de ADNc para su uso con la presente invención a partir de células que expresan o contienen las secuencias. Brevemente, en una realización se transcribe inversamente ARNm de una célula que expresa el gen de interés con transcriptasa inversa usando oligo dT o cebadores aleatorios. El ADNc monocatenario después puede amplificarse mediante PCR (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.683.202, 4.683.195 y 4.800.159; *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, Erlich (ed.),
 20 Stockton Press, 1989)) utilizando cebadores de oligonucleótidos complementarios a secuencias en cada lado de las secuencias deseadas. En particular, un ADN bicatenario se desnaturaliza por calentamiento en presencia de polimerasa Taq estable al calor, cebadores de ADN específicos de secuencia, ATP, CTP, GTP y TTP.

25 Se produce ADN bicatenario cuando la síntesis es completa. Este ciclo puede repetirse muchas veces, dando como resultado una amplificación factorial del ADN deseado. También pueden sintetizarse moléculas de ácido nucleico que son llevadas y/o expresadas por los retrovirus recombinantes descritos en el presente documento, por ejemplo, en un sintetizador de ADN Applied Biosystems Inc. (por ejemplo, el sintetizador de ADN APB modelo 392 (Foster City, Calif.).

30 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto habitual en la fabricación y el uso de la misma. Los ejemplos no pretenden de ningún modo limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

35 Los resultados de los experimentos que se describen en lo siguientes ejemplos demuestran que las células productoras de lentivirus pueden modificarse para expresar DAF/CD55 y que las células productoras modificadas de este modo pueden producir partículas víricas que son resistentes a la inactivación por la rama del complemento del suero humano. Este método produce partículas de lentivirus recombinantes en un título muy alto, proporcionando un sistema de entrega de genes que ofrece las ventajas de los vectores retrovíricos y de lentivirus sin la desventaja de
 40 la inactivación por el complemento. La protección de las partículas de lentivector de la inactivación por el complemento ofrece una ventaja crítica para aplicaciones de terapia génica satisfactorias, en particular las que implican la administración intravenosa del vector.

Ejemplo 1

45 **Preparación de vectores de lentivirus de 3ª generación recombinantes que incorporan la proteína inhibidora del complemento DAF**

Se usó una fuente comercial de ADN para aislar el gen para DAF/CD55. La secuencia de DAF se amplificó por PCR a partir del plásmido de ADN adquirido en el mercado de la American Type Culture Collection (ATCC). Este producto se conoce como el Clon de Consorcio I.M.A.G.E. humano N.º 3.317.033, y el clon se depositó en la ATCC y se le asignó el N.º de Registro 5530612. Se construyó un plásmido de expresión de DAF y se utilizó en la preparación de vectores de lentivirus recombinantes. El vector de lentivirus en el que se incorporó DAF se sometió a ensayo en un ensayo de inactivación del complemento. En ausencia de DAF/CD55, la infectividad de los vectores de lentivirus se reduce hasta 1000 veces después de la exposición a suero humano. La incorporación de DAF/CD55 en las
 55 partículas del lentivector confiere casi el 100 % de protección frente a esta inactivación.

Los presentes ejemplos emplean vectores de lentivirus de VIH de tercera generación (véase, por ejemplo, Kumar et al., *Hum. Gene Ther.* (2003) 14:67-77). Los vectores de VIH empleados en estos ejemplos tienen tres genes del VIH suprimidos (*tat*, *nef* y *vpu*) y los vectores se producen a través de la expresión de la proteína Rev en *trans* (véase, por ejemplo, Dull et al., (1998) *J. Virol.*, 72:8463-8471).

Ejemplo 2**Preparación de vectores de lentivirus de 3ª generación recombinantes que incorporan el inhibidor del complemento DAF**

5 Los vectores de lentivirus de tercera generación recombinantes descritos anteriormente se produjeron mediante transfección transitoria en células 293T como se indica a continuación: se sembraron 5×10^6 células 293T en placas de 10 cm de diámetro 24 horas antes de la transfección en Medio de Dulbecco Modificado de Iscove con (JRH Biosciences) un 10 % de suero bovino fetal (JRH Biosciences) irradiado e inactivado por calor, penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (100 µg/ml, Gibco) y L-glutamina 2 mM (JRH Biosciences) en una incubadora de CO₂ al 5 %. El medio de cultivo se cambió 2 horas antes de la transfección. El ADN del plásmido se usó como se indica a continuación para transfectar 1 placa: 3,5 µg de plásmido de envuelta de VSV-G pMD2-VSVG-env; 6,5 µg de plásmido de empaquetamiento pMDLg/pRRE; 2,5 µg de plásmido de Rev pRSV-Rev; y 10 µg de plásmido de vector de transferencia pRRLsinCMVGFPPre. Para las preparaciones que incorporaban la proteína DAF, se incluyó un quinto plásmido en la transfección: 10 µg de pMD2-DAF, un plásmido de expresión de DAF. El precipitado se formó usando precipitación con fosfato de calcio con reactivos y procedimientos obtenidos de Clontech (Kit de Transfección CalPhos, n.º K2051-1). El medio se sustituyó 16 horas después de la transfección. El medio acondicionado se recogió después de otras 24 horas, se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm y se concentró mediante ultracentrifugación en un Rotor SW28 a 19.500 rpm durante 2 h 20 min (concentrado).

20 Los títulos se determinaron mediante la infección de células 293T en un formato de placa de 6 pocillos: se sembraron 5×10^4 células por pocillo 24 horas antes de la infección. Se diluyó en serie medio que contenía vector 10 veces en medio de cultivo y se usó 1 ml de vector diluido para infectar 1 pocillo de células diana en presencia de Polybrene (8 µg/ml) en 2 ml de volumen total. El medio en las células infectadas se cambió 24 horas más tarde. Después de otras 48 horas, las células transducidas se recogieron por tripsinización y resuspensión en 1 ml de medio. Las células se sedimentaron por centrifugación en una centrífuga clínica durante 2 min y se resuspendieron en medio de fijación: PBS + 1 % de formaldehído (Sigma). Las células se almacenaron a 4 °C hasta el análisis FACS para determinar el % de células positivas para GFP usando un Becton-Dickinson FACSort. El título se calcula con la siguiente fórmula: % de células positivas para GFP / 100 x número de células (1×10^5 para 293T) x factor de dilución = unidades infecciosas/ml. (Solo se usaron porcentajes inferiores al 25 % porque el análisis FACS no es lineal por encima del 25 %).

Ejemplo 3**Preparación de vectores de lentivirus de 3ª generación recombinantes que incorporan la proteína inhibidora del complemento DAF y ensayo para determinar la sensibilidad del complemento de suero humano**

40 La sensibilidad del complemento se determinó usando el siguiente procedimiento. Se dividió el suero de donantes humanos individuales en dos porciones y una porción de cada uno se inactivó por calor a 56 °C durante 1 hora para eliminar la actividad del complemento. Se diluyeron dos preparaciones de vector concentradas a un total de 1×10^6 unidades infecciosas/ml: 1 preparación de vector de lentivirus de 3ª generación pseudotipado con VSVG (Sin DAF) y 1 preparación de vector de lentivirus de 3ª generación pseudotipado con VSVG con proteína DAF incorporada. Las preparaciones de vector se diluyeron 1:4 en suero humano normal o inactivado por calor y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las reacciones de control se realizaron con el vector diluido 1:4 en medio (sin suero). Cada reacción se diluyó otras 5 veces con medio y se hicieron dos diluciones más en serie con factor de dilución 10 de cada muestra. Las tres diluciones para cada reacción se usaron para infectar células 293T en un ensayo de titulación como se ha descrito anteriormente. El medio en las células infectadas se cambió 24 horas más tarde. Después de otras 72 horas las células infectadas se recogieron por tripsinización y se suspendieron en PBS/Formaldehído al 1 %. Se determinó el % de células positivas para GFP mediante análisis FACS y los valores de titulación se calcularon para cada reacción. El título determinado para la reacción de control (vector incubado en ausencia de suero) se estableció como la recuperación del título arbitrario del 100 % para esa preparación de vector. Los títulos determinados para el vector incubado en presencia de suero normal o inactivado por calor se compararon con el valor de control y se expresaron como la recuperación relativa en porcentaje.

55 Los resultados de los experimentos anteriores se describieron como se indica a continuación y se ilustran en las Figuras 1-3.

60 La Figura 1 muestra que DAF confiere resistencia al complemento a los vectores de lentivirus pseudotipados con VSVG. Esta figura muestra la recuperación relativa de título después de la exposición a suero que contenía (suero normal) o que carecía (suero inactivado por calor) de actividad del complemento. En la Figura 1 se presentan los resultados de los materiales compuestos de dos experimentos independientes con dos conjuntos independientes de preparaciones de vector. Los datos del lado izquierdo de la Figura 1 muestran que los vectores de lentivirus pseudotipados con proteína de la envuelta VSVG son sensibles a la inactivación por complemento en suero de un subconjunto de donantes humanos. La comparación de las barras de color blanco (activo por complemento) con las barras de color negro (inactivo por complemento) muestra que los vectores pueden perder unidades infecciosas de 3 a 50 veces. La mayoría de los donantes muestran una inactivación del vector de al menos 10 veces. Como se

muestra en el lado derecho de la Figura 1, los vectores que incorporaron DAF incubados con suero de los mismos donantes humanos muestran muy poca inactivación dependiente del complemento. La incorporación de DAF protege el vector de la inactivación en hasta el 100 % con una activación residual de menos de 4 veces.

5 La Figura 2 muestra que MCP/CD46 también puede proteger los vectores de lentivirus pseudotipados con VSV-G de la inactivación por el complemento humano. Los vectores de lentivirus con y sin proteínas inhibidoras del complemento se sometieron a ensayo para determinar la sensibilidad a la inactivación por el complemento como en la Figura 1. Las muestras de vector sometidas a ensayo llevaban el transgén GFP y se pseudotiparon con la glucoproteína de la envuelta de VSV-G. Una preparación (VSVG, izquierda) se hizo en ausencia de cualquier proteína inhibidora del complemento exógena y las otras (VSVG + DAF, medio) y (VSVG + MCP) se generaron mediante la cotransfección de plásmidos de expresión de mamífero que codificaban DAF/CD55 o MCP/CD46, respectivamente. Las muestras de suero eran de cinco donantes humanos individuales.

10 La Figura 3 muestra que DAF/CD55 también protege el vector pseudotipado con gp64 de la inactivación por el complemento. Los vectores de lentivirus con y sin proteínas inhibidoras del complemento se sometieron a ensayo para determinar la sensibilidad a la inactivación por el complemento como en la Figura 1. Las muestras de vector sometidas a ensayo llevaban el transgén GFP y se pseudotiparon con la glucoproteína de la envuelta gp64 de baculovirus. Una preparación (gp64, izquierda) se hizo en ausencia de cualquier proteína inhibidora del complemento exógena y la otra (gp64 + DAF, derecha) se generó mediante la cotransfección de un plásmido de expresión de mamífero que codificaba DAF/CD55. Las muestras de suero eran de cinco donantes humanos individuales.

REIVINDICACIONES

1. Una célula de empaquetamiento de lentivirus que comprende:

- 5 (a) una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gen gag, un gen pol o genes gag y pol;
(b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen heterólogo de la envuelta; y
(c) una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína reguladora del complemento (CRP);

10 en la que dicho lentivirus resiste la activación del complemento sin necesidad de la creación de una proteína quimérica que fusione CRP con una región transmembrana y en la que dichas primera, segunda y tercera secuencia de nucleótidos se proporcionan en vectores separados.

15 2. La célula de empaquetamiento de la reivindicación 1, en la que la CRP comprende factor de aceleración de la desintegración (DAF), CD59, proteína de cofactor de membrana (MCP), receptor del complemento 1 (CR1) o factor homólogo de restricción (HRF).

20 3. La célula de empaquetamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la primera, la segunda y la tercera secuencia de nucleótidos se integran de forma estable en el genoma de la célula de empaquetamiento.

4. La célula de empaquetamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el lentivirus es un virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

25 5. La célula de empaquetamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que carece de un gen tat funcional.

6. La célula de empaquetamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una cuarta secuencia de nucleótidos que comprende un gen rev.

30 7. La célula de empaquetamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que carece de genes funcionales seleccionados entre vif, vpr, vpu, vpx y nef, o una combinación de los mismos.

35 8. La célula de empaquetamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el gen de la envuelta comprende un gen de la envuelta de VSV-G o un gen de la envuelta de baculovirus.

9. Una célula productora de lentivirus que comprende la célula de empaquetamiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vector de transferencia de lentivirus.

40 10. La célula productora de lentivirus de la reivindicación 9, que tiene un título de al menos aproximadamente 5×10^5 unidades infecciosas por ml, un título de al menos aproximadamente 2×10^6 unidades infecciosas por ml o un título de al menos aproximadamente 1×10^7 unidades infecciosas por ml.

11. Un conjunto de vectores de lentivirus que comprende:

- 45 (a) una primera secuencia de nucleótidos que comprende un gen gag, un gen pol o genes gag y pol unidos operativamente a una secuencia de control de la expresión;
(b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende un gen heterólogo de la envuelta unido operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
50 (c) una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína reguladora del complemento (CRP) unida operativamente a una secuencia de control de la expresión;

55 en el que dicho lentivirus resiste la activación del complemento sin necesidad de la creación de una proteína quimérica que fusione CRP con una región transmembrana y en el que dichas primera, segunda y tercera secuencia de nucleótidos se proporcionan en vectores separados.

12. El conjunto de la reivindicación 11, en el que la CRP comprende de factor de aceleración de la desintegración (DAF), CD59, MCP, CR1 o HRF.

60 13. El conjunto de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el gen heterólogo de la envuelta es un gen de la envuelta de VSV-G o un gen de la envuelta de baculovirus.

14. El conjunto de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho conjunto de vectores de lentivirus carece de un gen tat funcional.

**DAF/CD55 confiere resistencia al complemento a
vectores de lentivirus pseudotipados con VSVG**

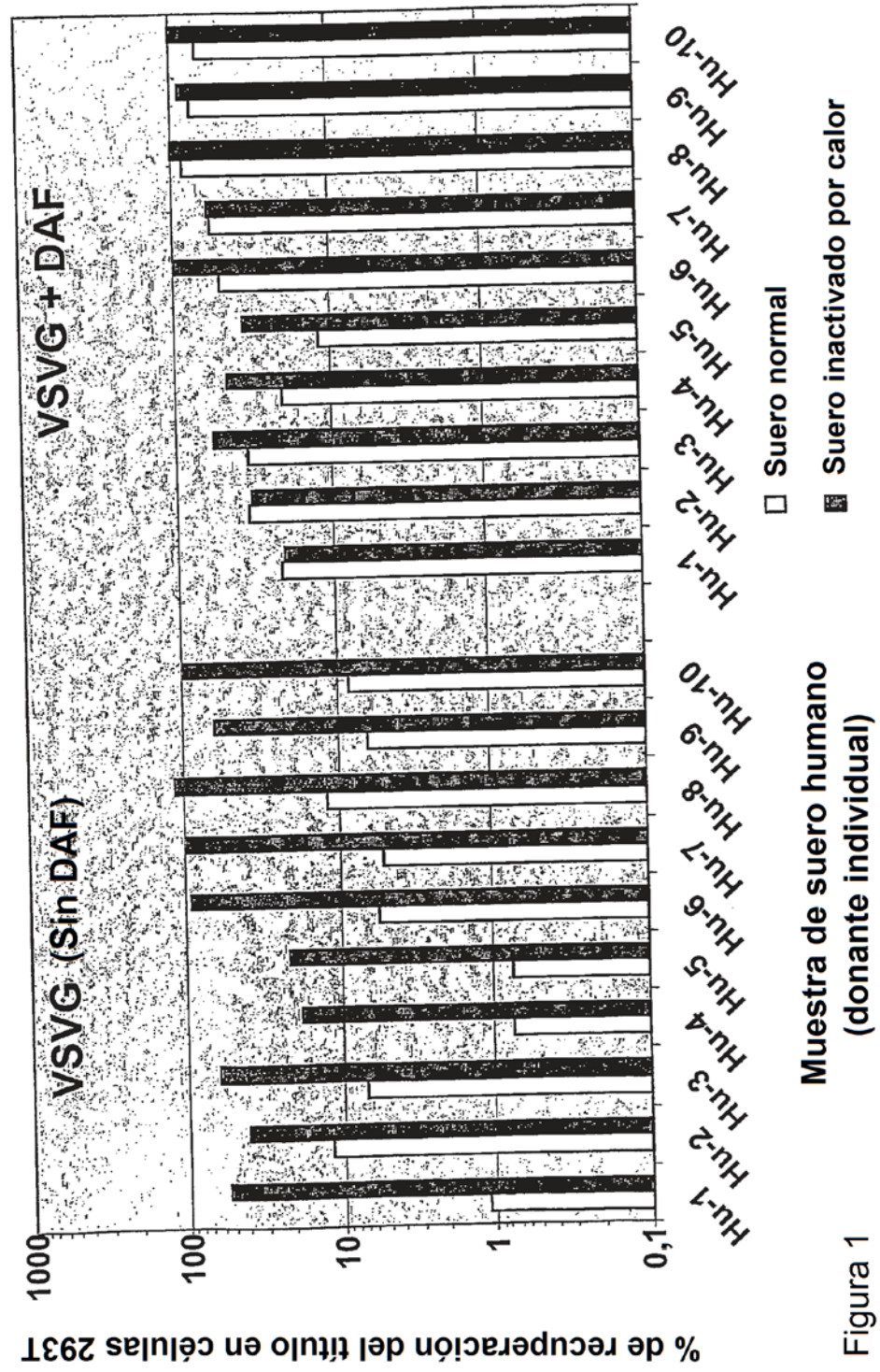


Figura 1

MCP/CD46 también puede proteger los vectores de lentivirus pseudotipados con VSV-G de la inactivación por el complemento humano

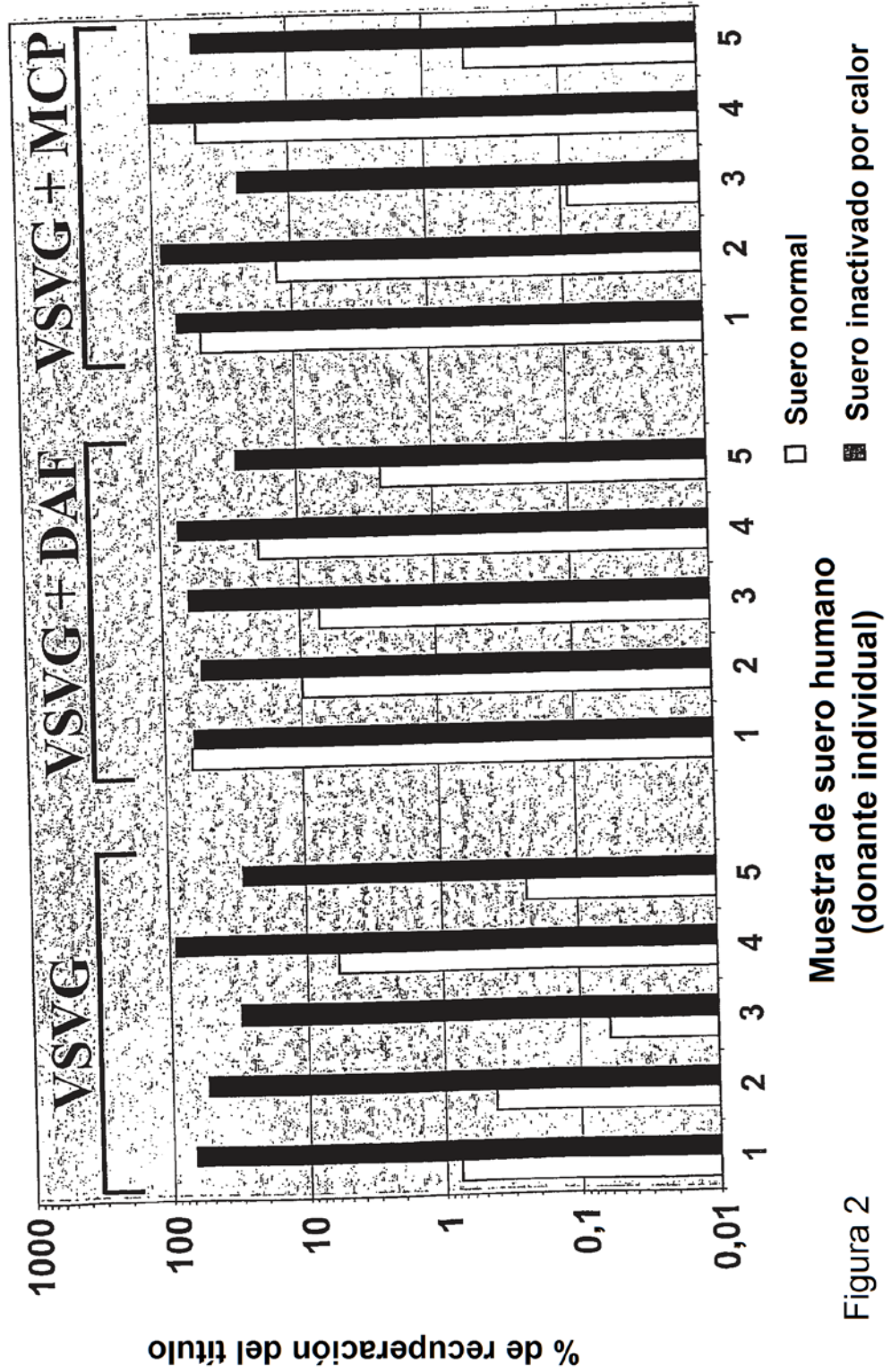


Figura 2

DAF/CD55 también protege el vector pseudotipado con gp64 de la inactivación por el complemento

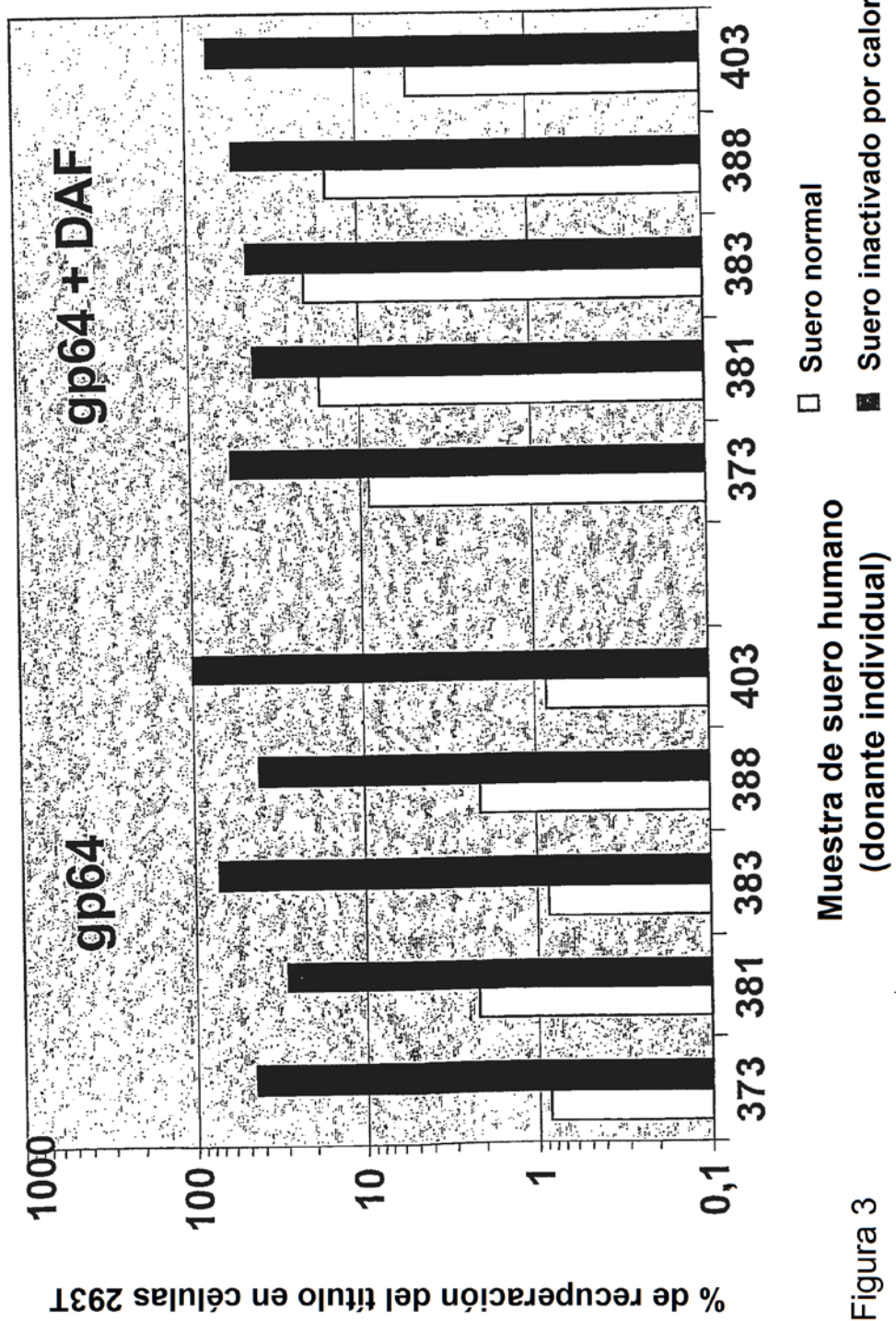


Figura 3