

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 988**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/48 (2006.01)

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2008 PCT/US2008/086409**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2009 WO09076524**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008 E 08859393 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2222861**

54 Título: **Vectores retrovirales modificados del tracto de polipurinas**

30 Prioridad:

11.12.2007 US 7118 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.04.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 BYNUM HALL CAMPUS BOX 4105
CHAPEL HILL, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

KAFRI, TAL

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 664 988 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

Vectores retrovirales modificados del tracto de polipurinas

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La materia aquí descrita se refiere a vectores retrovirales defectuosos en la integración y a vectores retrovirales defectuosos en la integración para su uso en procedimientos para insertar una secuencia de nucleótidos de interés en un genoma de la célula huésped, tal como en terapia génica y en la investigación de biología básica.

10 ANTECEDENTES

[0002] La capacidad de introducir una secuencia de gen exógeno o nativo particular en una célula y de controlar la expresión de ese gen es valioso en los campos de la medicina y la investigación biológica. Dicha capacidad tiene una amplia variedad de aplicaciones útiles, incluyendo, pero no limitado a, el estudio de la regulación de genes y el diseño de una base terapéutica para el tratamiento de una enfermedad.

[0003] La introducción de un gen exógeno o nativo en una célula huésped se puede facilitar mediante la introducción de una secuencia de gen en un vector de ácido nucleico adecuado. Se han desarrollado una variedad de procedimientos que permiten la introducción de dicho vector recombinante en una célula huésped deseada. El uso de vectores virales puede dar lugar a una rápida introducción de la molécula recombinante en una amplia variedad de células huésped.

[0004] Los retrovirus son virus de ARN que se replican a través de un intermedio proviral de ADN que suele estar integrado en el genoma de la célula huésped infectada. Todos los retrovirus conocidos comparten características del ciclo de replicación, incluido el empaquetamiento del ARN viral en los viriones, la entrada en las células diana, la transcripción inversa de ARN viral para formar el provirus de ADN, y la integración estable del provirus en el genoma de la célula diana. La replicación de provirus simples competentes comprenden típicamente repeticiones terminales largas (LTR) reguladoras y los genes gag, pro, pol y env que codifican proteínas del núcleo (gag), una proteasa (pro), transcriptasa inversa (pol), ARNasa H (pol), la integrasa (pol) y glicoproteínas de la envoltura (env). Los retrovirus complejos también comprenden típicamente genes accesorios adicionales.

[0005] Los vectores retrovirales son una herramienta común para el suministro de genes en que la capacidad de los vectores retrovirales para suministrar un gen de copia única no reordenado en una amplia gama de células los hace muy adecuados para la transferencia de genes a una célula. Aunque los vectores retrovirales recombinantes permiten la integración de un transgén en un genoma de célula huésped, la mayoría de los retrovirus sólo pueden transducir células que se dividen. Esto puede limitar su uso para transferencia génica in vivo a células no proliferativas, tales como hepatocitos, miofibrias, células madre hematopoyéticas (HSC) y neuronas. Las células que no se dividen son el tipo de célula predominante de larga duración en el cuerpo, y representan las dianas más deseables de la transferencia de genes, incluyendo el hígado, músculo y cerebro.

[0006] Los lentivirus son un subgrupo de retrovirus que son capaces de infectar células que no se dividen. Estos virus incluyen, pero no se limitan a, VIH-1, VIH-2, VIS, VAIE y VIF. Los lentivirus poseen genes gag, pol y env además de otros genes accesorios que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR).

[0007] Un desafío clave para la transferencia génica basada en el uso de vectores retrovirales es lograr una expresión transgénica estable, a la vez que se minimiza la mutagénesis de inserción y la inducción de la respuesta al daño de ADN debido a la presencia de ADN de doble cadena. Un enfoque para evitar la mutagénesis de inserción es dirigir la integración del transgén a una localización específica en el genoma.

[0008] Un enfoque para conseguir la expresión del transgen y a la vez minimizar la mutagénesis de inserción es producir vectores lentivirales no integrativos (NIL). Los vectores NIL han sido producidos mediante la introducción de combinaciones de mutaciones realizadas para desactivar la proteína integrasa en sí o para alterar las secuencias de reconocimiento de la integrasa (ATT) en la LTR viral (véase, por ejemplo, Yanez-Munoz et al. (2006) Nat Med 12 (3): 348-353; Nightingale et al (2006) Mol Ther 13 (6): 1121-32). Recientes estudios in vitro e in vivo muestran que los vectores NIL pueden mediar la transducción estable y permitir altos niveles de expresión del transgén (ver, por ejemplo, Yanez-Munoz et al (2006) Nat Med 12 (3): 348-353; Nightingale et al. (2006) Mol Ther 13 (6): 1121-1132). Por lo tanto, la alta eficiencia de la transferencia génica y la expresión mediada por lentivirus se pueden aprovechar in vivo sin un requisito para la integración del vector. Sin embargo, las formas de vectores generados por los enfoques anteriores comprenden vectores lineales, así como tres tipos de formas de vectores episomal circulares. La presencia de formas de ADN lineales, que constituyen la mayoría de las formas episomales, tienen el potencial de inducir respuesta al daño del ADN debido a la presencia de extremos de ADN de doble cadena libres.

[0009] Ma H. et al., Molecular Therapy, vol. 10, no.1, páginas 139 - 149, describen el desarrollo de un vector lanzadera de VIH-1 que contiene una sola LTR. El plásmido pTK113 descrito en el presente documento incluye un 3'PPT de tipo natural, es decir, el elemento 3'PPT no está eliminado.

5

[0010] Miles et al., J. Virology, vol. 79, no. 11, páginas 6859-6867, describen el efecto de las mutaciones de PPT en la replicación de VIH-1. Se encontró que, en ausencia de un PPT funcional, puede producirse un cierto nivel de replicación, particularmente los cambios tanto en el extremo 5' como 3' pueden reducir la infectividad del VIH-1.

10 [0011] La materia aquí descrita proporciona sistemas de vectores defectuosos en la integración mejorados, cuyo producto final es una población homogénea de formas de vectores circulares que contienen 1-LTR que son capaces de mediar la transferencia génica en células animales con un menor riesgo de inducir respuesta al daño del ADN. El hecho de que sólo se generan formas 1-LTR permite un mejor control de los vectores no integradores. Además, el nuevo sistema de vectores defectuosos en la integración es significativamente más eficiente que el sistema retroviral no integrador
15 utilizado actualmente en el contexto de aplicaciones particulares, que se basan en formas de vectores circulares incluyendo, pero no limitado a, FLIP y la integración del vector mediada por cre.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

20 [0012] La invención a la que la presente memoria descriptiva se refiere se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

[0013] La presente invención da a conocer un vector retroviral que comprende un ácido nucleico aislado que comprende:

25 a) una o dos repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales,
b) una señal de empaquetamiento,
c) un elemento sensible a rev,
d) un promotor eucariota, unido operativamente a
e) una secuencia de nucleótidos heteróloga, opcionalmente en el que la secuencia heteróloga comprende uno o más genes marcadores, opcionalmente seleccionados entre un gen de 3-galactosidasa, un gen de higromicina, un gen de blastocidina, un gen de MGMT, un gen de neomicina, un gen de puromicina, un gen de citosina desaminasa, un gen de fosfatasa alcalina secretada, un gen de proteína fluorescente, y combinaciones de los mismos; genes terapéuticos; genes antivirales; genes antitumorales; genes de citoquinas; genes que codifican antígenos; secuencias que pueden asociarse con la cromatina del huésped; secuencias que codifican una proteína que puede asociarse con el ADN del huésped y la cromatina del huésped y el ácido nucleico del vector; secuencias que codifican una proteína que tiene actividad de metilación del ADN, y combinaciones de los mismos,
30 y opcionalmente un elemento regulador post-transcripcional, en el que el vector retroviral carece de un 3'-PPT, opcionalmente un cPPT funcional. En una realización adicional, se describe un casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un tracto de 3'-polipurinas (3'-PPT), en el que el casete de transferencia del vector retroviral defectuoso en la integración opcionalmente:
35 carece de un tracto de polipurinas central funcional (cPPT), y/o comprende:
una secuencia heteróloga,
una única LTR,
una delección de auto-inactivación en la región U3 de la LTR, en la que la parte eliminada de la región U3 está opcionalmente reemplazada por un promotor inducible, y/o
40 un sitio de recombinación dirigido al sitio, en el que el sitio de recombinación dirigido al sitio está opcionalmente en la región U3 de la LTR y/o es loxP y FRT.

[0014] En una realización adicional, se describe un kit de vectores retrovirales que comprende:

50 (a) un casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3'-PPT; y
(b) una línea celular de empaquetamiento que comprende al menos una construcción que codifica una o más proteínas necesarias para empaquetar el vector retroviral.

[0015] Además, se describe un procedimiento de producción de partículas de vector defectuoso en la integración, que comprende transfectar una línea celular de empaquetamiento con un casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3'-PPT, en el que la línea celular de empaquetamiento proporciona proteínas del vector retroviral a empaquetar.

60 [0016] La materia aquí descrita proporciona casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración que carecen de un tracto de 3' polipurinas (PPT). En algunas realizaciones, los casetes de transferencia de vectores retrovirales carecen de un tracto de polipurinas central funcional (cPPT). En algunas realizaciones, los casetes de transferencia de vectores retrovirales comprenden una secuencia heteróloga.

5 **[0017]** La materia aquí descrita proporciona ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos heteróloga, una o dos repeticiones terminales largas (LTR) retrovirales, una señal de empaquetamiento, un elemento sensible a rev y un promotor eucariota, en los que el ácido nucleico carece de un 3' PPT. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos comprenden un origen de replicación viral o una secuencia que puede mediar directa o indirectamente en la replicación del ácido nucleico del vector por un huésped. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos comprenden un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección bacteriano situado entre las dos LTR. En algunos aspectos, el origen de replicación viral se selecciona del grupo que consiste en OriP del virus de Epstein-Barr y un origen de replicación de SV40. En algunos aspectos, la secuencia que puede mediar directa o indirectamente en la replicación del ácido nucleico del vector por la célula huésped se selecciona del grupo que consiste en (a) una secuencia reconocida por la maquinaria de replicación de la célula huésped; (b) una secuencia que codifica una proteína que puede asociarse con y/o modular la maquinaria de replicación de la célula huésped; y (c) una secuencia que codifica una proteína que puede asociarse con la proteína de la parte (b) o puede reconocer una secuencia del vector. En algunos aspectos, la secuencia heteróloga se selecciona del grupo que consiste en uno o más genes marcadores, genes terapéuticos, genes antivirales, genes antitumorales, genes de citoquinas, genes que codifican antígenos, las secuencias que se pueden asociar con la cromatina del huésped, secuencias que codifican una proteína que puede asociarse con el ADN del huésped y la cromatina del huésped y el ácido nucleico del vector, secuencias que codifican una proteína que tiene actividad de metilación del ADN, actividad de desmetilación del ADN, y/o actividad de desaminación de citidina, y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la secuencia heteróloga es una secuencia de nucleótidos de unos genes asociados con la desdiferenciación y/o el establecimiento de células madre pluripotentes inducidas (iPS), tales como, pero no limitadas a, Oct4, Nanog, Klf4, Sox2, FGF-4, Ssea-1, Stat-3 y Myc. En algunos aspectos, los genes marcadores se seleccionan del grupo que consiste en gen de β -galactosidasa, gen de higromicina, gen de blastocidina, gen de MGMT, gen de neomicina, gen de puromicina, gen de citosina desaminasa, gen de la fosfatasa alcalina secretada, genes de proteínas fluorescentes, y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos carecen de un cPPT funcional. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos comprenden un elemento regulador post-transcripcional (PRE). En algunas realizaciones, un PRE comprende un elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota.

30 **[0018]** En algunos aspectos, los ácidos nucleicos aquí descritos están presentes en un vector. En algunos aspectos, el vector comprende una única LTR. En algunos aspectos, el vector comprende una delección de auto-inactivación en la región U3 de la LTR. En algunas realizaciones, la porción eliminada de la región U3 está reemplazada por un promotor inducible. En algunos aspectos, los vectores aquí descritos comprenden un sitio de recombinación dirigido al sitio. En algunos aspectos, el sitio de recombinación dirigido al sitio está en la región U3 de la LTR. En algunos aspectos, el sitio de recombinación dirigido al sitio se selecciona del grupo que consiste en loxP y FRT. En algunos aspectos, los vectores aquí descritos comprenden un sitio de restricción en la región U3 de la LTR. En algunos aspectos, el vector comprende secuencias de al menos dos retrovirus diferentes. En algunos aspectos, dichos al menos dos retrovirus diferentes incluyen un lentivirus. En algunos aspectos, la LTR del vector comprende secuencias de al menos dos retrovirus diferentes. En algunos aspectos, dichos al menos dos retrovirus diferentes incluyen un lentivirus. En algunos aspectos, el vector comprende secuencias de al menos dos retrovirus diferentes y al menos una de las secuencias codifica un elemento cis que proporciona para el empaquetamiento cruzado del vector en una partícula viral. En algunos aspectos, el elemento cis se selecciona del grupo que consiste en un RRE, un fragmento de gen env de la región que flanquea el RRE, y un cPPT.

[0019] La materia aquí descrita también proporciona partículas retrovirales recombinantes que comprenden los vectores aquí descritos. En algunos aspectos, la partícula retroviral recombinante es para uso en terapia génica.

45 **[0020]** La materia aquí descrita también proporciona provirus retrovirales producidos mediante la infección de células diana con las partículas retrovirales recombinantes aquí descritas.

[0021] La materia aquí descrita también proporciona ARNm u otro ARN de los provirus retrovirales aquí descritos.

50 **[0022]** La materia aquí descrita también proporciona líneas celulares de empaquetamiento de vectores retrovirales inducibles que comprenden los vectores retrovirales aquí descritos y al menos una construcción que codifica una o más proteínas necesarias para empaquetar el vector retroviral.

55 **[0023]** La materia aquí descrita también proporciona kits de vectores retrovirales. En algunos aspectos, los kits retrovirales comprenden (a) un casete de transferencia del vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3'PPT; y (b) una línea celular de empaquetamiento que comprende al menos una construcción que codifica una o más proteínas necesarias para el vector retroviral a empaquetar.

60 **[0024]** La materia aquí descrita también proporciona procedimientos para producir partículas de vectores defectuosos en la integración. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden transfectar una línea celular de empaquetamiento

con un casete de transferencia del vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3' PPT, en el que la línea celular de empaquetamiento proporciona proteínas del vector retroviral a empaquetar.

5 **[0025]** La materia aquí descrita también proporciona procedimientos para expresar una secuencia de nucleótidos de interés en una célula de un animal sin la integración de la secuencia de nucleótidos en el genoma del animal. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden infectar una o más células con las partículas retrovirales de defectuosas en la integración aquí descritas.

10 **[0026]** La materia aquí descrita también proporciona procedimientos para insertar una secuencia de nucleótidos de interés en el genoma de una célula huésped de una manera específica de sitio. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden (a) transducir una célula huésped compatible con un vector defectuoso en la integración aquí descrito que comprende en combinación operable la secuencia de nucleótidos de interés y una o más secuencias de recombinación dirigida al sitio; y (b) transfectar o transducir la célula huésped compatible con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa que puede mediar en la integración específica de sitio en la secuencia de recombinación, en el que la transfección o transducción de la parte (b) pueden tener lugar por separado o en la misma etapa que la parte (a), en el que la secuencia de nucleótidos de interés se inserta de una manera específica de sitio en el genoma de una célula huésped. En algunos aspectos, la recombinasa capaz de mediar en la integración específica de sitio en la secuencia de recombinación es Cre o FLP. En algunas realizaciones, la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa es el vector defectuoso en la integración de la parte (a). En algunos aspectos, la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa es un vector, plásmido, o molécula de ácido nucleico distinto del vector defectuoso en la integración de la parte (a).

25 **[0027]** La materia aquí descrita también proporciona procedimientos para insertar una secuencia de nucleótidos de interés en el genoma de una célula huésped de una manera no específica. En algunos aspectos, los procedimientos comprenden (a) transducir una célula huésped con el vector defectuoso en la integración, que comprende en combinación operable, la secuencia de nucleótidos de interés y una o más secuencias de transposón; y (b) transfectar o transducir la célula huésped con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa que puede mediar en la integración en el genoma del huésped, en el que la transfección o transducción de la parte (b) pueden tener lugar por separado o en la misma etapa que la parte (a), en el que la secuencia de nucleótidos de interés se inserta en el genoma de la célula huésped. En algunos aspectos, la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa es el vector defectuoso en la integración de la parte (a). En algunos aspectos, la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa es un vector, plásmido o molécula de ácido nucleico distinto del vector defectuoso en la integración de la parte (a). En algunos aspectos, el transposón o de transposasa es de un tipo *mariner*. En algunos aspectos, el transposón o de transposasa es la Bella Durmiente.

40 **[0028]** Es un objetivo de la materia aquí descrita proporcionar casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración que carecen de tratos de 3'polipurinas.

45 **[0029]** Un objetivo de la materia aquí descrita que se ha expuesto anteriormente, y que se logra en su totalidad o en parte por la materia aquí descrita, otros objetivos resultarán evidentes a medida que avance la descripción cuando se toma en relación con los dibujos adjuntos como mejor se describen a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0030]

50 La figura 1 es un diagrama esquemático que representa factores celulares que afectan a la formación de episoma. Abreviaturas: LTR - repetición terminal larga; ARN - ARN genómico viral; 1-LTR - forma circular con una LTR; 2-LTR - forma circular con 2 LTR; HR – mecanismo de reparación del ADN basado en la recombinación homóloga de células huésped; NHEJ – mecanismo de unión del extremo de ADN no homólogo (NHEJ) de la célula huésped.

55 La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra casetes de transferencia de vector retrovirales representativos de la materia aquí descrita. Abreviaturas adicionales: Amp - secuencia de codificación de resistencia a la ampicilina; pUC ori - origen de replicación de la serie pUC de vectores (Vieira y Messing (1982) Gene 19 (3): 259-268); CMV - principal promotor temprano inmediato de citomegalovirus; RRE - elemento sensible a rev del virus de inmunodeficiencia humana (VIH); cPPT - tracto de polipurinas central; GFP – secuencia de codificación de la proteína verde fluorescente; PRE - elemento regulador post-transcripcional; ΔPPT - PPT deleción; U3Δ - LTR Región U3 que contiene una deleción que la hace auto inactivante (SIN); R - LTR Región R; U5 - LTR Región U5.

60

La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra una comparación entre sí de un casete de transferencia de vector retroviral de la materia aquí descrita (por ejemplo, vector lanzadera pTK459) y un vector estándar (por ejemplo, pTK113).

5 La figura 4 es un diagrama esquemático que representa el análisis de la relación de los diferentes formas episomales de VIH-1 utilizando un ensayo de Hirt basado en un vector lanzadera. Las células diana (por ejemplo, células 293T) fueron transducidas con partículas de vector usando técnicas estándar y se utilizó la extracción de Hirt (Hirt (1967) J Mol Biol 26: 365-369) para aislar las formas circulares de ADN de doble cadena derivado del vector. Estas formas circulares se transformaron en bacterias utilizando técnicas estándar, y se identificaron los clones bacterianos que contenían las formas de vectores circulares. Se preparó el ADN a partir de los clones bacterianos identificados, se digirió con una o más enzimas de restricción que cortaban las formas de vector circular una vez cada una, y los ADN lineales digeridos se separaron en geles de agarosa. La presencia de una LTR vs. dos LTR se puede determinar mediante la determinación de los tamaños de las moléculas lineales.

15 La figura 5 es una autorradiografía de un gel que muestra un análisis de transferencia Southern que demuestra la formación de episomas de VIH-1 1-LTR mediante vectores con PPT y PPT/cPPT eliminados. Se transdujeron células 293T con un vector tradicional de VIH-1 vTK945 (carriles 1, 4), vector con PPT eliminado vTK1023 (carriles 2, 5), o vector con PPT y cPPT eliminados, vTK1039 (carriles 3, 6). El ADN extraído de las células transducidas a las 16 horas (carriles 1-3) o 5 pases (carriles 4-6) después de la transducción se sometió a análisis de transferencia Southern. La mayoría del ADN de vector episomal generado por el vector WT, vTK945, fue lineal (carril 1). Además, solo los genomas vTK945 integrados pudieron ser detectados después de 5 pases de células en cultivo (carril 4). Por el contrario, sólo las formas 1-LTR de vTK1023 y vTK1039 pudieron ser detectados a las 24 horas después de la transducción. El hecho de que el genoma de estos vectores no se pudo detectar después de 5 pases después de la transducción (carriles 5, 6) indica que los vectores con PPT eliminado son defectuosos en la integración (tal como se esperaba de la falta de formas de vectores lineales).

25 La figura 6 es un gráfico de barras que muestra los resultados de un ensayo con un vector lanzadera empleado para analizar las abundancias relativas de 1-LTR, 2-LTR y los episomas circulares mutantes. Las células 293T se transdujeron con vectores lanzadera de integración o no integración con (pTK1054; véase la figura 7) o sin (TK1046; véase la figura 7) la secuencia de PPT, y se recogieron episomas 16 horas después de la transducción. Cada transducción se realizó por triplicado. La delección del PPT condujo a una disminución en 2-LTR y episomas circulares mutantes, con un aumento concomitante de episomas circulares de 1-LTR alcanzando aproximadamente el 100%.

35 La figura 7 es un diagrama esquemático de vector lanzadera pTK1054 y vector lanzadera pTK1046. Como puede verse en la figura, el vector lanzadera (pTK1054) incluye una secuencia de PPT, mientras que el vector lanzadera (pTK1046) carece de esta secuencia. Abreviatura adicional: WPRE - elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 **[0031]** La capacidad de los vectores retrovirales para suministrar grandes cargas útiles genéticas en células que no se dividen abre vías prometedoras para la introducción de una o más secuencias particulares de ácidos nucleicos en una célula. Sin embargo, realizar el pleno potencial del sistema de vectores retrovirales en una modalidad de suministro válida actualmente está impedido por la posibilidad de mutagénesis de inserción inducida por vector retroviral. En consecuencia, la materia aquí descrita proporciona vectores retrovirales deficientes en la integración y procedimientos de fabricación y uso de los mismos, que tratan los riesgos asociados con la mutagénesis de inserción mediada por vectores retrovirales, entre otros problemas de la técnica.

50 **[0032]** Las estrategias anteriores para la producción de vectores retrovirales no integradores se basan en la inhibición de la etapa de integración del ciclo de vida del vector durante el cual se inserta el ADN de vector lineal en el genoma del huésped. En estas estrategias previamente descritas, los vectores retrovirales no integradores son generados mediante el empleo de sistemas de empaquetamiento deficientes en integrasa o mediante la mutación de sitios att del vector. En consecuencia, las formas de vectores episomales generadas mediante estas estrategias comprenden formas de ADN lineales o circulares diferentes incluyendo 1-LTR, 2-LTR y productos de autointegración (véase la figura 1).

55 **[0033]** En cambio, la estrategia proporcionada en la materia aquí descrita se basa en la generación de vectores retrovirales no integradores mediante el direccionamiento del proceso de transcripción inversa retroviral, que precede a la integración. La estrategia proporcionada en el presente documento se basa en la reducción drástica de la producción del ADN lineal del vector durante la transcripción inversa y en la generación de esencialmente sólo círculos de ADN de 1-LTR. El hecho de que se generan esencialmente sólo formas de 1-LTR permite un mejor control de los vectores no integradores. Uno de los beneficios es que la reducción drástica en el ADN lineal del vector disminuye el riesgo de inducción de la respuesta a la reparación del daño del ADN. Además, el nuevo sistema de vectores defectuosos en la

integración es significativamente más eficiente que el sistema retroviral no integrador utilizado actualmente en el contexto de aplicaciones particulares, que se basan en formas de vectores circulares que incluyen, pero no limitado a, la integración del vector mediada por FLP y Cre. Además, las formas episomales de 1-LTR de la materia aquí descrita que contienen un origen viral de replicación o una secuencia que puede mediar en la replicación del ácido nucleico del vector por un huésped se pueden mantener en las células diana que se dividen. Por el contrario, en aplicaciones en las que se desea solamente la expresión génica transitoria, las formas episomales de 1-LTR de la materia aquí descrita que no contienen un origen de replicación son útiles, ya que no se mantienen en células en división.

I. DEFINICIONES

[0034] Debe entenderse que la terminología usada en este documento es con el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no pretende ser limitante. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece la materia aquí descrita. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la materia aquí descrita, en el presente documento se describen procedimientos y materiales representativos. Siguiendo la convención de leyes de patentes de hace mucho tiempo, los términos "un", "una" y "el/la" se refieren a "uno o más" cuando se usa en esta solicitud, incluyendo en las reivindicaciones.

[0035] A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción y así sucesivamente, usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones deben entenderse que se modifican en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener mediante la materia aquí descrita.

[0036] El término "aproximadamente", tal como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad de peso, tiempo, dosis, etc., se entiende que abarca variaciones de en algunos aspectos, $\pm 20\%$, en algunos aspectos, $\pm 10\%$, en algunos aspectos, $\pm 5\%$, en algunos aspectos, $\pm 1\%$, y en algunos aspectos, $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los procedimientos descritos y/o emplean las composiciones descritas.

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "elemento regulador en cis" o "elemento cis" tiene el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la técnica; es decir, es una región de ADN o ARN que regula la expresión de genes localizados en la misma cadena de ADN o ARN.

[0038] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula huésped compatible" significa una célula huésped que tiene una o más secuencias de recombinación dirigida al sitio en su genoma que son compatibles con las secuencias de recombinación en un vector defectuoso en la integración de la materia aquí descrita. Las secuencias de recombinación de célula huésped compatibles son útiles en los procedimientos aquí descritos para la inserción de una secuencia de nucleótidos de interés en un genoma huésped de una manera específica de sitio.

[0039] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "construcción" se puede utilizar en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren un segmento o segmentos de ADN, un segmento o segmentos de ARN, o combinaciones de los mismos de una célula a otra. El término "vector" se puede usar de forma intercambiable con "construcción". El término "construcción" puede incluir construcciones de ácido nucleico circular incluyendo, pero no limitado a, construcciones de plásmidos, construcciones de fagémidos, vectores cósmidos, así como construcciones de ácido nucleico lineal, incluyendo, pero no limitado a, los productos de PCR.

[0040] El término "terapia génica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un procedimiento general para el tratamiento de una afección patológica en un sujeto mediante la inserción de un ácido nucleico exógeno en una célula o células apropiadas dentro del sujeto. El ácido nucleico se inserta en la célula de manera que mantenga su funcionalidad, por ejemplo, mantenga la capacidad de expresar un polipéptido particular. En ciertos casos, la inserción del ácido nucleico exógeno da lugar a la expresión de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido particular.

[0041] El término "heterólogo", cuando se usa con referencia a un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende uno o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico puede producirse de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para formar un nuevo ácido nucleico funcional. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico tiene un promotor de un gen dispuesto para dirigir la expresión de una secuencia codificante de un gen diferente. Por lo tanto, con referencia a la secuencia codificante, el promotor es heterólogo. El término "heterólogo" se puede utilizar también para referirse a un

ácido nucleico que no es nativo de una célula huésped. En algunos aspectos, en el presente documento, el término "secuencia de nucleótidos heteróloga" se usa indistintamente con "secuencia de nucleótidos de interés".

5 **[0042]** "Aislado", tal como se usa en el presente documento, significa que una secuencia de ácido nucleico, fragmento de ADN, molécula de ADN, secuencia de codificación u oligonucleótido de origen natural se extrae de su entorno natural, o es una molécula sintética o producto clonado.

10 **[0043]** Una "LTR" es una repetición terminal larga. Las LTR son secuencias encontradas en retrovirus. La secuencia de LTR tiene típicamente al menos varios cientos de bases de longitud, generalmente teniendo repeticiones invertidas en sus extremos (a menudo empezando con TGAA y terminando con TTCA), y flanqueada con repeticiones directas cortas duplicadas dentro de las secuencias de ADN de células que flanquean un sitio de inserción. Las repeticiones invertidas cortas están implicadas en la integración del ADN viral de longitud completa, ADN de retrotransposón o ADN del vector en el genoma del huésped. La secuencia de integración se denomina a veces att, para la unión. Dentro de las LTR residen tres subregiones distintas: U3 (la región potenciadora y promotora, transcrita a partir de la 5' LTR), R (repetida en ambos extremos del ARN), y U5 (transcrita a partir de la 5' LTR). La LTR y sus secuencias flanqueantes asociadas (sitios de unión a cebadores, sitios de corte y empalme, secuencias de unión por dimerización y secuencias de encapsidación) comprenden las secuencias que actúan en cis de un vector retroviral. Las fuentes de secuencias de ácido nucleico de LTR, por ejemplo, fragmentos o segmentos de ácido nucleico, incluyen, pero no se limitan a, retrovirus murinos, secuencias de VL30 murinas, retrotransposones, retrovirus de simio, retrovirus aviar, retrovirus felinos, lentivirus, retrovirus aviares y retrovirus bovinos, virus espumosos.

[0044] En la presente invención, sólo están cubiertas aquellas realizaciones en las que está eliminado el elemento 3'PPT. En aras de la conveniencia, sin embargo, también el término "no funcional" se define en este documento.

25 **[0045]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "no funcional" se refiere a un elemento (por ejemplo, un PPT) que no funciona como lo hace normalmente in vivo. Como ejemplo no limitativo, la frase "PPT no funcional" puede referirse a un PPT que está ausente, mutado, o modificado de otro modo de tal manera que no puede realizar las funciones normalmente realizadas por el PPT en un retrovirus o un vector basado en un retrovirus. Alternativamente o adicionalmente, un "PPT no funcional" puede referirse a un PPT que está presente en un vector en una ubicación que impide que el PPT realice sus funciones in vivo y/o in vitro normales. Por lo tanto, un PPT no funcional se vuelve no funcional mediante la delección u otra mutación de su secuencia de nucleótidos, y en algunos aspectos, un PPT no funcional se vuelve no funcional al estar presente en una ubicación dentro de un ácido nucleico que impide una o más de sus actividades biológicas naturales.

35 **[0046]** Los términos "no integrador" y la "deficiente en la integración" se usan indistintamente en este documento para describir los vectores virales y las partículas virales de la materia aquí descrita. Los vectores/partículas virales no integradoras y deficientes en la integración de la materia aquí descrita carecen de un PPT funcional, de manera que la transducción de estos vectores/partículas dan lugar a la producción de esencialmente sólo episomas de 1-LTR. Como resultado de la reducción drástica en la producción de ADN de doble cadena lineal, esencialmente se elimina la capacidad típica para insertar secuencias de ácido nucleico en el genoma de un huésped a través de la forma de ADN de doble cadena lineal.

45 **[0047]** El término "ácido nucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria, y a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con ácidos nucleicos de manera similar a nucleótidos de origen natural. Los términos "ácido nucleico", "secuencia de nucleótidos", y "secuencia de polinucleótido" se usan en el presente documento de forma intercambiable.

50 **[0048]** El término "combinación operable" se refiere a una disposición funcional de dos o más secuencias de ácido nucleico diferentes en la que su proximidad física entre sí da lugar a una o más de las diferentes secuencias de ácidos nucleicos que influyen en una actividad y/o un comportamiento de otra de las diferentes secuencias de ácido nucleico. En algunos aspectos, una secuencia de nucleótidos de interés está en combinación operable con una o más secuencias de recombinación dirigidas al sitio. En tales aspectos, la secuencia de nucleótidos de interés puede integrarse en una ubicación deseada en un ácido nucleico mediante la acción de una nucleasa o recombinasa en dicha una o más secuencias de recombinación dirigidas al sitio.

55 **[0049]** El término "unido operativamente" se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o conjunto de sitios de unión al factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

60

5 [0050] Un "casete de empaquetamiento" codifica componentes necesarios para la producción de partículas virales por una célula transducida por el vector de empaquetamiento. El casete de empaquetamiento incluye opcionalmente todos los componentes necesarios para la producción de partículas virales, u opcionalmente incluye un subconjunto de los componentes necesarios para el empaquetado viral. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula de empaquetamiento se transforma con más de un casete de empaquetamiento, cada uno de los cuales tiene una función complementaria en la producción de una partícula viral.

10 [0051] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a todas las formas de ADN y ARN, ya sea de una sola cadena, de doble cadena, u orden superior. Un polinucleótido se puede sintetizar químicamente o se puede aislar de una célula u organismo huésped. Un polinucleótido particular puede contener residuos de origen natural, así como residuos sintéticos.

15 [0052] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tracto de polipurinas" se refiere a una secuencia de aproximadamente 15 nucleótidos que está presente en un ARN retroviral (o en un ARN derivado de un vector de base retroviral) que puede servir como un sitio de unión al cebador para la síntesis de ADN de cadena positiva. Véase, por ejemplo, Rausch & Le Grice (2004) Int J Biochem Cell Biol 36: 1752-1766.

20 [0053] Un "retrovirus" es un virus de ADN diploide de cadena simple que se replica a través de la transcriptasa inversa y un virión retroviral. Un retrovirus puede ser competente para la replicación o incompetente para la replicación. Los retrovirus representativos incluyen, pero no se limitan a, virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV), virus leucemia del mono gibón (GaLV), virus de la leucemia felina (VLF), Virus del Sarcoma de Rous (VSR), HTLV-1 y HTLV-2, virus del mono Mason-Pfizer, virus de la leucemia bovina, retrovirus espumoso de chimpancé, virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 y VIH-2, virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV), virus de inmunodeficiencia felina (VIF) y virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) y virus espumosos.

30 [0054] Tal como se usa en el presente documento, el término "autoinactivantes" y variantes gramaticales del mismo se refieren a vectores y virus codificados por los mismos que cuando entran en una célula producen una forma celular que tiene una LTR LTRs que son transcripcionalmente inactivos en la célula infectada. Generalmente, esto se logra mediante la introducción de deleciones u otras mutaciones debilitantes en las LTR del vector. Como tal, una "deleción autoinactivante" es una deleción en un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral) que después de la transcripción inversa carece de la función del promotor en la LTR o LTRs virales. Cabe indicar, sin embargo, que en algunos aspectos, el vector autoinactivante comprende un promotor dentro del cuerpo del vector (por ejemplo, fuera de la única LTR o entre las dos LTRs) que puede permanecer competente para dirigir la transcripción de una secuencia de nucleótidos unida operativamente.

40 [0055] Varios términos del presente documento se pueden utilizar indistintamente. De este modo, "virión", "virus", "partícula viral", "vector viral", "construcción viral", "partícula de vector", "casete de transferencia de vector viral" y "vector lanzadera" pueden referirse a virus y partículas de tipo virus que son capaces de introducir ácidos nucleicos en una célula a través de un mecanismo de entrada de tipo viral. Tales partículas de vectores pueden, en ciertas circunstancias, mediar en la transferencia de genes en las células que infectan. Tales células se denominan en el presente documento como "células diana". Los vectores retrovirales se han utilizado para transferir genes explotando el proceso infeccioso viral. Los genes exógenos clonados en el genoma retroviral se pueden liberar a células susceptibles a la infección o transducción por el retrovirus.

45 II. ASPECTOS REPRESENTATIVOS Y/O REALIZACIONES

50 [0056] La materia aquí descrita describe casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración de los que se ha suprimido el tracto de polipurinas (PPT) retroviral parental o de otro modo carecen de un PPT funcional (realizaciones representativas se muestran en las figuras 2 y 3; véase también Ma & Kafri (2004) Mol Ther 10 (1): 139-149; Bayer et al (2008) Mol Ther 16 (12): 1968-76). En consecuencia, en algunos aspectos, de la materia aquí descrita, se proporcionan procedimientos y composiciones que comprenden vectores retrovirales defectuosos en la integración, incluyendo pero no limitados a, los que se muestran en las figuras 2 y 3. La materia aquí descrita también incluye vectores retrovirales defectuosos en la integración como los representados en las figuras 2 y 3, pero que comprende además un origen de replicación viral o una secuencia que puede mediar directa o indirectamente en la replicación del ácido nucleico del vector por un huésped. En algunos aspectos, el origen de replicación viral incluye, pero no se limita a, EBV-OriP y un origen de replicación de SV40. En algunos aspectos, el origen de replicación viral se encuentra en dirección 5' del promotor CMV. En las composiciones de vectores retrovirales descritas en este documento, la producción del ADN lineal del vector durante la transcripción inversa se reduce drásticamente. De hecho, el ADN del vector retroviral generado en el transcurso de la transducción de vectores de los vectores aquí descritos con círculos de ADN de doble cadena esencialmente uniformemente episomales que contienen sólo 1-LTR (véase las figuras 4-6).

[0057] Por ejemplo, se empleó un ensayo de vector lanzadera para analizar las abundancias relativas de 1-LTR, 2-LTR y episomas circulares mutantes. Las células 293T se transdujeron con los vectores lanzadera integradores (IN+) o no integradores (IN-) con (pTK1054; ver la Figura 7) o sin (TK1046; ver la Figura 7) la secuencia de PPT, y los episomas se recogieron 16 horas después de la transducción. Cada transducción se realizó por triplicado. Tal como se muestra en la Figura 6, la supresión del PPT condujo a una disminución en 2-LTR y episomas circulares mutantes, con un aumento concomitante de episomas circulares de 1-LTR próximo al 100%. La figura 7 es un diagrama esquemático del vector lanzadera pTK1054, que incluye una secuencia de PPT, y el vector lanzadera pTK1046, que carece de la secuencia de PPT.

[0058] Se caracterizó un posible mecanismo de formación del vector VIH-1 episomal de 1-LTR de acuerdo con los procedimientos y composiciones de la materia aquí descrita y los datos representativos se muestran en las figuras 4 y 5. Basándose en el hecho de que el nivel de formas de vectores de 1-LTR no se redujo en líneas celulares defectuosas en la recombinación homóloga, el papel de la transcripción inversa en la formación de formas de vectores de 1-LTR fue un foco. Específicamente, se demostró que la supresión de tracto de polipurinas (PPT) del vector redujo drásticamente la formación de formas de vector de ADN bicatenario lineal y en consecuencia hizo que el vector fuera defectuoso en la integración (Figura 5). Tal como se muestra en la figura 5, sólo las formas de vectores de 1-LTR se pudieron detectar en células 293T transducidas con vector sin PPT. Aunque no se desea limitarse a ninguna teoría particular de operación, se cree que la supresión del PPT puede permitir la síntesis de ADN de cadena positiva a partir de un cebador de ARN críptico situado en dirección 5' del cPPT. Esto puede evitar el "segundo salto", lo que da lugar a la formación sólo formas de vectores de 1-LTR. Alternativamente, o adicionalmente, la síntesis de la segunda cadena puede iniciarse desde el sitio de unión al cebador (PBS) y/o un sitio críptico.

[0059] En algunos aspectos de la materia aquí descrita, se proporcionan composiciones que comprenden casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración que carecen de un tracto de 3' polipurinas (PPT). En algunos aspectos, se proporcionan ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos heteróloga, una o dos repeticiones terminales largas (LTRs) retrovirales, una señal de empaquetamiento, un elemento sensible a rev, y un promotor eucariota, donde el ácido nucleico carece de un 3' PPT. En algunos aspectos, el ácido nucleico aislado comprende además un origen de replicación bacteriano situado entre las dos LTR. En algunos aspectos, el ácido nucleico aislado comprende además un marcador de selección bacteriana (es decir, una secuencia codificante bacteriana la expresión de la cual permite que una célula crezca en presencia de un compuesto que de otro modo impediría su crecimiento y/o lo mataría). En algunos aspectos, el ácido nucleico aislado comprende además un origen de replicación viral o una secuencia que puede mediar directa o indirectamente la replicación del ácido nucleico del vector por un huésped. En algunas realizaciones, el origen de replicación viral incluye, pero no se limita a, OriP de virus de Epstein Barr (EBV) y un origen de replicación de SV40. En algunos aspectos, se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se proporcionan partículas retrovirales recombinantes que comprenden los vectores.

[0060] En algunos aspectos, se proporcionan líneas celulares de empaquetamiento de vectores retrovirales inducibles que comprende los vectores y al menos una construcción que codifica las proteínas necesarias para el vector retroviral a empaquetar.

[0061] En algunos aspectos, se proporcionan procedimientos para producir partículas de vectores defectuosos en la integración, que comprende transfectar una línea celular de empaquetamiento con un casete de transferencia del vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3'PPT, en los que la línea celular de empaquetamiento proporciona proteínas del vector retroviral a empaquetar.

[0062] En algunos aspectos, se proporcionan kits de vectores retrovirales que comprenden un casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3'PPT; y una línea celular de empaquetamiento que comprende al menos una construcción que codifica proteínas necesarias para el vector retroviral a empaquetar.

[0063] En algunos aspectos, se proporcionan procedimientos para lograr la expresión de genes de una secuencia de nucleótidos de interés en las células de un animal sustancialmente sin la integración de la secuencia de nucleótidos en el genoma del animal, que comprende infectar las células con una partícula retroviral defectuosa en la integración de la materia aquí descrita que comprende la secuencia de nucleótidos de interés. En algunos aspectos, se pueden mantener los casetes de transferencia de los vectores retrovirales defectuosos en la integración de la materia aquí descrita que comprenden un origen de replicación viral o una secuencia que puede mediar la replicación del ácido nucleico del vector por las células huésped en las células diana que se dividen. Por el contrario, en aplicaciones donde se desea solamente la expresión génica transitoria, los casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración de la materia aquí descrita no comprenden un origen de replicación son útiles, ya que no se mantienen en células en división. Por ejemplo, en algunos aspectos, los casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración de la materia aquí descrita que carecen de un origen de replicación son útiles para obtener la expresión transitoria de un gen

de interés en las células madre. En algunos aspectos, el gen de interés es un gen que dirige la diferenciación de las células madre. En algunos aspectos, las células madre son útiles para la terapia génica.

- 5 **[0064]** En algunos aspectos, la secuencia que puede mediar directa o indirectamente la replicación del ácido nucleico del vector por la célula huésped incluye, pero no se limita a una secuencia reconocida por la maquinaria de replicación de la célula huésped; una secuencia que codifica una proteína que puede asociarse con y/o modular la maquinaria de replicación de la célula huésped; y una secuencia que codifica una proteína que puede asociarse con la proteína que puede asociarse con y/o modular la maquinaria de replicación de la célula huésped.
- 10 **[0065]** Por consiguiente, las composiciones de vectores retrovirales no integradores y procedimientos de la materia aquí descrita se pueden utilizar para evitar la mutagénesis por inserción. En algunos aspectos, se proporcionan procedimientos para lograr la expresión de genes de una secuencia de nucleótidos de interés en las células de un animal mediante el direccionamiento de la integración de la secuencia de nucleótidos en el genoma del animal. En algunos aspectos, las composiciones de vectores defectuosos en la integración de la materia aquí descrita son útiles, ya que son
- 15 significativamente más eficientes que los sistemas retrovirales no integradores utilizados actualmente en el contexto de aplicaciones basadas en formas de vectores circular, incluyendo, pero no limitado a, integración de vectores mediada por FLP y Cre. Por ejemplo, las composiciones de vectores retrovirales no integradores y procedimientos de la materia aquí descrita se pueden utilizar para obtener la integración dirigida de un gen de interés en el genoma de un huésped mediante la combinación de las composiciones de vectores retrovirales no integradores y procedimientos de la materia aquí descrita
- 20 con sistemas de replicación autónomos conocidos y sistemas de recombinación dirigidos al sitio. En algunos aspectos, los casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración de la materia aquí descrita son útiles para obtener la expresión de un gen de interés en células madre. En algunos aspectos, las células madre son útiles para la terapia génica.
- 25 **[0066]** En algunos aspectos de la materia aquí descrita, se proporcionan casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración que carecen de un tracto de 3' polipurinas (PPT) que comprenden una secuencia heteróloga. En algunos aspectos, la secuencia heteróloga incluye, pero no se limita a, uno o más genes marcadores, genes terapéuticos, genes antivirales, genes antitumorales, genes de citoquinas, genes que codifican antígenos, secuencias que se pueden asociar con la cromatina huésped, secuencias que codifican una proteína que puede asociarse
- 30 con el ADN del huésped y la cromatina del huésped y el ácido nucleico del vector, secuencias que codifican una proteína que tiene actividad de metilación del ADN, actividad de desmetilación del ADN, actividad de citosina desaminasa, y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, una secuencia que puede asociarse con la cromatina del huésped se selecciona del grupo que consiste en una región asociada a matriz (MAR) y una región de unión a estructura/matriz (S/MAR). En algunos aspectos, los genes marcadores incluyen, pero no se limitan a, gen de β -galactosidasa, gen de la higromicina, gen de blastocidina, gen de MGMT, gen de neomicina, gen de puomicina, gen de la citosina desaminasa, gen de la fosfatasa alcalina secretada, genes de proteínas fluorescentes, y combinaciones de los mismos.
- 35 **[0067]** En algunos aspectos, se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos de la materia aquí descrita. En algunos aspectos, los vectores comprenden solamente una única LTR. En algunas realizaciones, el vector comprende secuencias de al menos dos retrovirus diferentes. En algunos aspectos, dichos al menos dos retrovirus diferentes incluyen un lentivirus. En algunos aspectos, el vector LTR comprende secuencias de al menos dos retrovirus diferentes. En algunos aspectos, dichos al menos dos retrovirus diferentes incluyen un lentivirus. En algunos aspectos, el vector comprende secuencias de al menos dos retrovirus diferentes y al menos una de las secuencias codifica un elemento cis que proporciona para el empaquetamiento cruzado del vector en una partícula viral. En algunos aspectos, el elemento cis incluye pero no se limita a un RRE, un fragmento del gen Env de la región que flanquea el RRE y un cPPT. En algunos aspectos, los casetes de transferencia de vectores retrovirales defectuosos en la integración que carecen de un 3' PPT incluyen casetes de transferencia de vector retrovirales que comprenden secuencias de al menos dos retrovirus diferentes.
- 40 **[0068]** En algunos aspectos, la materia aquí descrita proporciona procedimientos para insertar una secuencia de nucleótidos de interés en un genoma huésped de una manera específica de sitio, que comprende transducir una célula huésped compatible con los vectores defectuosos en la integración dados a conocer en el presente documento, que comprenden en combinación operable la secuencia de nucleótidos de interés y una o más secuencias de recombinación dirigidas al sitio; y transfectar o transducir la célula huésped compatible con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa que puede mediar en la integración específica de sitio en la secuencia
- 45 de recombinación.
- 50 **[0069]** En algunos aspectos, no hay una segunda etapa de transfección transducción y la transfección/transducción se producen en la misma etapa. En algunas realizaciones, la recombinasa capaz de mediar en la integración específica de sitio en la secuencia de recombinación es Cre o FLP. En algunos aspectos, no hay segunda etapa de transducción/transfección y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa es el vector defectuoso en la integración. En algunos aspectos, la etapa de transfección/transducción se produce en la misma
- 55
- 60

etapa y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa está en un vector o plásmido o molécula de ácido nucleico separados del vector defectuoso en la integración. En algunos aspectos, la secuencia reconocida por la nucleasa o recombinasa que pueden mediar en la integración específica de sitio es un sitio loxP o un sitio pseudo-loxP. En algunos aspectos, las secuencias son sitios de reconocimiento para Cre o variantes de Cre. En algunos aspectos, el gen que se inserta puede estar situado en la región U3 de la secuencia 3' LTR. En algunas realizaciones, el vector incluye uno o más genes indicadores.

[0070] En algunos aspectos, la materia aquí descrita proporciona procedimientos para insertar una secuencia de nucleótidos de interés en un genoma de célula huésped de una manera no específica, que comprende: transducir una célula huésped con un vector defectuoso en la integración de la materia aquí descrita que comprende en combinación operable la secuencia de nucleótidos de interés y una o más secuencias de transposón; y transfectar o transducir la célula huésped compatible con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa que puede mediar en la integración en el genoma del huésped. En algunos aspectos, no hay segunda etapa de transfección/transducción y la transfección/transducción se produce en la misma etapa. En algunas realizaciones, la etapa de transfección/transducción se produce en la misma etapa y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa es el vector defectuoso en la integración. En algunas realizaciones, la etapa de transfección/transducción se produce en la misma etapa y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa está en un vector o plásmido o molécula de ácido nucleico separado del vector defectuoso en la integración. En algunos aspectos, el transposón y transposasa son de tipo *mariner*, tal como Bella Durmiente (véase por ejemplo la patente de Estados Unidos No. 6.613.752; Robertson (1993) Nature 362: 241-245; Cell Ivics et al (1997) 91: 501-510; Plasterk et al (1999) Trends Genet 15: 326-332; Zayed et al (2003) Nuc Acid Res 31 (9): 2313-2322; Arkhipova et al (2005) Proc Natl Acad Sci USA. 102: 11781-11786).

[0071] La materia aquí descrita actualmente describe el desarrollo de composiciones de vectores retrovirales no integradores y procedimientos. Los genomas de vectores retrovirales generados por las composiciones y procedimientos de la materia aquí descrita en el transcurso de la transducción del vector son formas circulares de ADN de 1-LTR de doble cadena episomales de forma sustancialmente uniforme. El hecho de que se generan esencialmente sólo formas de 1-LTR permite un mejor control de los vectores no integradores. Por consiguiente, las composiciones de vectores retrovirales no integradores y procedimientos de la materia aquí descrita tienen numerosos usos y beneficios para la consecución de la expresión génica de secuencias de nucleótidos de interés en células animales, incluyendo una disminución del riesgo de inducción de la respuesta de reparación de daño del ADN y un aumento significativo en la eficiencia cuando se utiliza en combinación con aplicaciones basadas en formas de vectores circulares incluyendo, pero no limitado a la integración del vector mediada por FLP y Cre.

REIVINDICACIONES

1. Vector retroviral que comprende un ácido nucleico que comprende:
 5 a) una o dos repeticiones terminales largas (LTRs) retrovirales,
 b) una señal de empaquetamiento,
 c) un elemento sensible a rev,
 d) un promotor eucariota, operativamente unido a
 e) una secuencia de nucleótidos heteróloga, opcionalmente en el que la secuencia heteróloga comprende uno o más genes marcadores, opcionalmente seleccionados entre un gen de 3-galactosidasa, un gen de higromicina, un gen de blastocidina, un gen de MGMT, un gen de neomicina, un gen de puromicina, un gen de citosina desaminasa, un gen de fosfatasa alcalina secretada, un gen de proteína fluorescente, y combinaciones de los mismos; genes terapéuticos; genes antivirales; genes antitumorales; genes de citoquinas; genes que codifican antígenos; secuencias que pueden asociarse con la cromatina del huésped; secuencias que codifican una proteína que puede asociarse con el ADN del huésped y la cromatina del huésped y el ácido nucleico del vector; secuencias que codifican una proteína que tiene actividad de metilación del ADN, y combinaciones de los mismos,
 10 y opcionalmente un elemento regulador post-transcripcional,
 en el que el vector retroviral carece de un tracto de 3'-polipurinas (3'-PPT),
 opcionalmente un cPPT funcional.
- 20 2. Vector retroviral, según la reivindicación 1, que comprende además:
 un origen de replicación viral, opcionalmente un OriP del virus de Epstein-Barr y un origen de replicación de SV40, una secuencia que puede mediar directa o indirectamente en la replicación del ácido nucleico del vector por un huésped, opcionalmente (a) una secuencia reconocida por la maquinaria de replicación de la célula huésped; (b) una secuencia que codifica una proteína que puede asociarse con y/o modular la maquinaria de replicación de la célula huésped; o (c) una
 25 secuencia que codifica una proteína que puede asociarse con la proteína de la parte (b) o que puede reconocer una secuencia del vector,
 un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección bacteriano situado entre las dos LTRs.
- 30 3. Vector retroviral, según la reivindicación 1, en el que el vector comprende:
 una sola LTR, y/o
 una delección autoinactivante en la región U3 de la LTR, en el que la porción eliminada de la región U3 está opcionalmente reemplazada con un promotor inducible, y/o
 un sitio de recombinación dirigida al sitio, en el que el sitio de recombinación dirigida al sitio está opcionalmente en la
 35 región U3 de la LTR y/o es loxP o FRT.
4. Vector retroviral, según la reivindicación 3, en el que el vector comprende una LTR que comprende un sitio de restricción en la región U3 de la LTR.
- 40 5. Vector retroviral, según la reivindicación 3 o 4, en el que el vector comprende secuencias, opcionalmente secuencias de LTR, de al menos dos retrovirus diferentes, y opcionalmente además en el que dichos al menos dos retrovirus diferentes incluyen un lentivirus y/o al menos una de las secuencias codifica un elemento cis que proporciona un empaquetamiento cruzado del vector en una partícula viral, opcionalmente en el que el elemento cis se selecciona del grupo que consiste en un RRE, un fragmento de gen Env de la región que flanquea un RRE y un cPPT.
- 45 6. Casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un tracto de 3'-polipurinas (3'-PPT), en el que el casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración, opcionalmente:
 carece de un tracto de polipurinas central (cPPT), y/o comprende:
 una secuencia heteróloga,
 una sola LTR,
 50 una delección autoinactivante en la región U3 de la LTR, en el que la porción eliminada de la región U3 está opcionalmente reemplazada con un promotor inducible, y/o
 un sitio de recombinación dirigida al sitio, en el que el sitio de recombinación dirigida al sitio está opcionalmente en la región U3 de la LTR y/o es loxP o FRT.
- 55 7. Partícula retroviral recombinante que comprende el vector, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector es opcionalmente para usar en terapia génica, o un provirus retroviral producido por la infección de células diana con la partícula retroviral recombinante, o ARN o ARNm de la partícula retroviral así producida.
- 60 8. Línea celular de empaquetamiento de vector retroviral inducible que comprende el vector retroviral, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y al menos una construcción que codifica una o más proteínas necesarias para el vector retroviral a empaquetar.

9. Kit de vector retroviral que comprende:
 (a) un casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3'-PPT; y
 (b) una línea celular de empaquetamiento que comprende al menos una construcción que codifica una o más proteínas necesarias para el vector retroviral a empaquetar.
10. Procedimiento para producir partículas de vector defectuoso en la integración, que comprende transfectar una línea celular de empaquetamiento con un casete de transferencia de vector retroviral defectuoso en la integración que carece de un 3'-PPT, en el que la línea celular de empaquetamiento proporciona proteínas para el vector retroviral a empaquetar.
11. Partícula retroviral defectuosa en la integración, según la reivindicación 7, para usar en un procedimiento para expresar una secuencia de nucleótidos de interés en una célula de un animal sin la integración de la secuencia de nucleótidos en el genoma del animal, comprendiendo el procedimiento infectar una o más células con la partícula retroviral defectuosa en la integración según la reivindicación 7.
12. Vector defectuoso en la integración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para usar en un procedimiento para la inserción de una secuencia de nucleótidos de interés en el genoma de una célula huésped de una manera específica de sitio, que comprende:
 (a) transducir una célula huésped compatible con el vector defectuoso en la integración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende en combinación operable la secuencia de nucleótidos de interés y una o más secuencias de recombinación dirigidas al sitio; y
 (b) transfectar o transducir la célula huésped compatible con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa que puede mediar en la integración específica de sitio en la secuencia de recombinación, opcionalmente Cre o Flp, en el que la transfección o transducción de la parte (b) puede tener lugar por separado o en la misma etapa que la parte (a),
 (c) en el que la secuencia de nucleótidos de interés se inserta de una manera específica de sitio en el genoma de la célula huésped.
13. Vector defectuoso en la integración para usar en un procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa es el vector defectuoso en la integración de la parte (a), o en el que la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una nucleasa o recombinasa es un vector, plásmido, o molécula de ácido nucleico distinto del vector defectuoso en la integración de la parte (a).
14. Vector defectuoso en la integración, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para usar en un procedimiento para la inserción de una secuencia de nucleótidos de interés en el genoma de una célula huésped de una manera no específica, que comprende:
 (a) transducir una célula huésped con el vector defectuoso en la integración, según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende en combinación operable, la secuencia de nucleótidos de interés y una o más secuencias de transposón; y
 (b) transfectar o transducir la célula huésped con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa que puede mediar en la integración en el genoma del huésped, en el que la transfección o transducción de la parte (b) puede tener lugar por separado o en la misma etapa que la parte (a),
 (c) en el que la secuencia de nucleótidos de interés se inserta en el genoma de la célula huésped, y en el que además el transposón o transposasa es opcionalmente de un tipo mariner, además opcionalmente es Bella durmiente.
15. Vector defectuoso en la integración para usar en un procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa es el vector defectuoso en la integración de la parte (a), o en el que la transfección o transducción de la parte (b) se produce en la misma etapa que la parte (a) y el ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una transposasa es una molécula de vector, plásmido o ácido nucleico distinto del vector defectuoso en la integración de la parte (a).

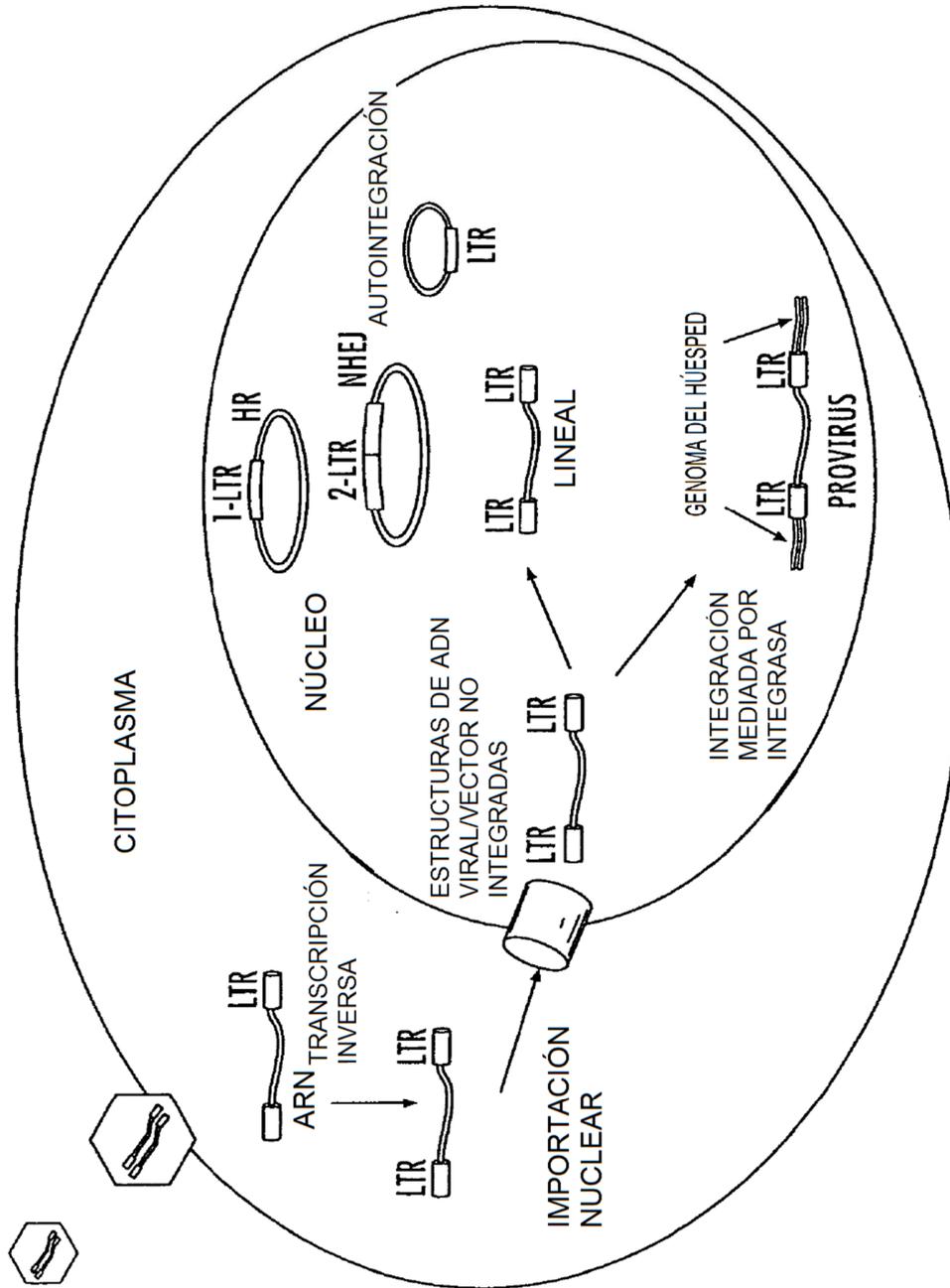


Figura 1

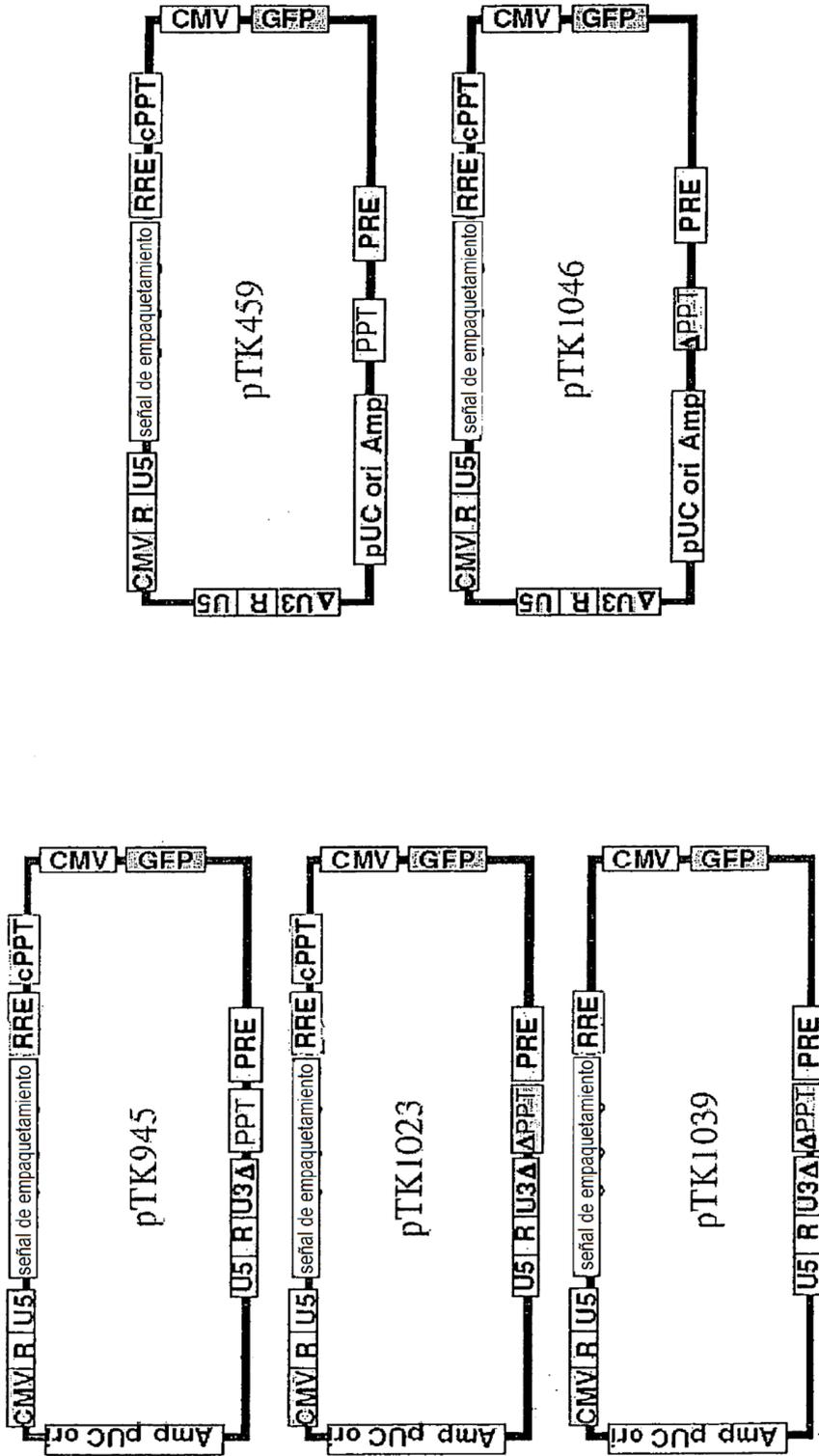


Figura 2

El vector lanzadera

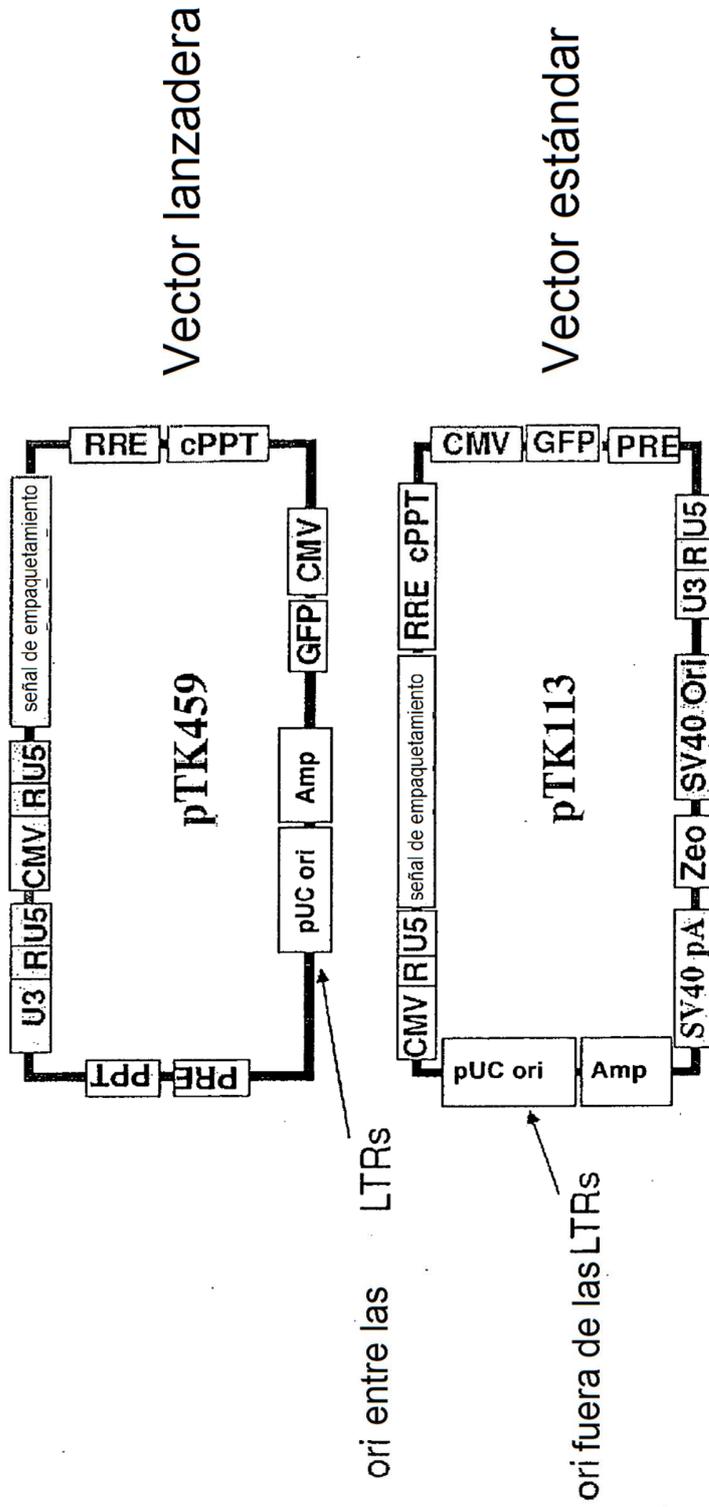


Figura 3

ANÁLISIS DE LA PROPORCIÓN DE LAS DIFERENTES FORMAS EPISOMALES DE VIH-1
MEDIANTE UN ENSAYO DE HIRT BASADO EN UN VECTOR LANZADERA

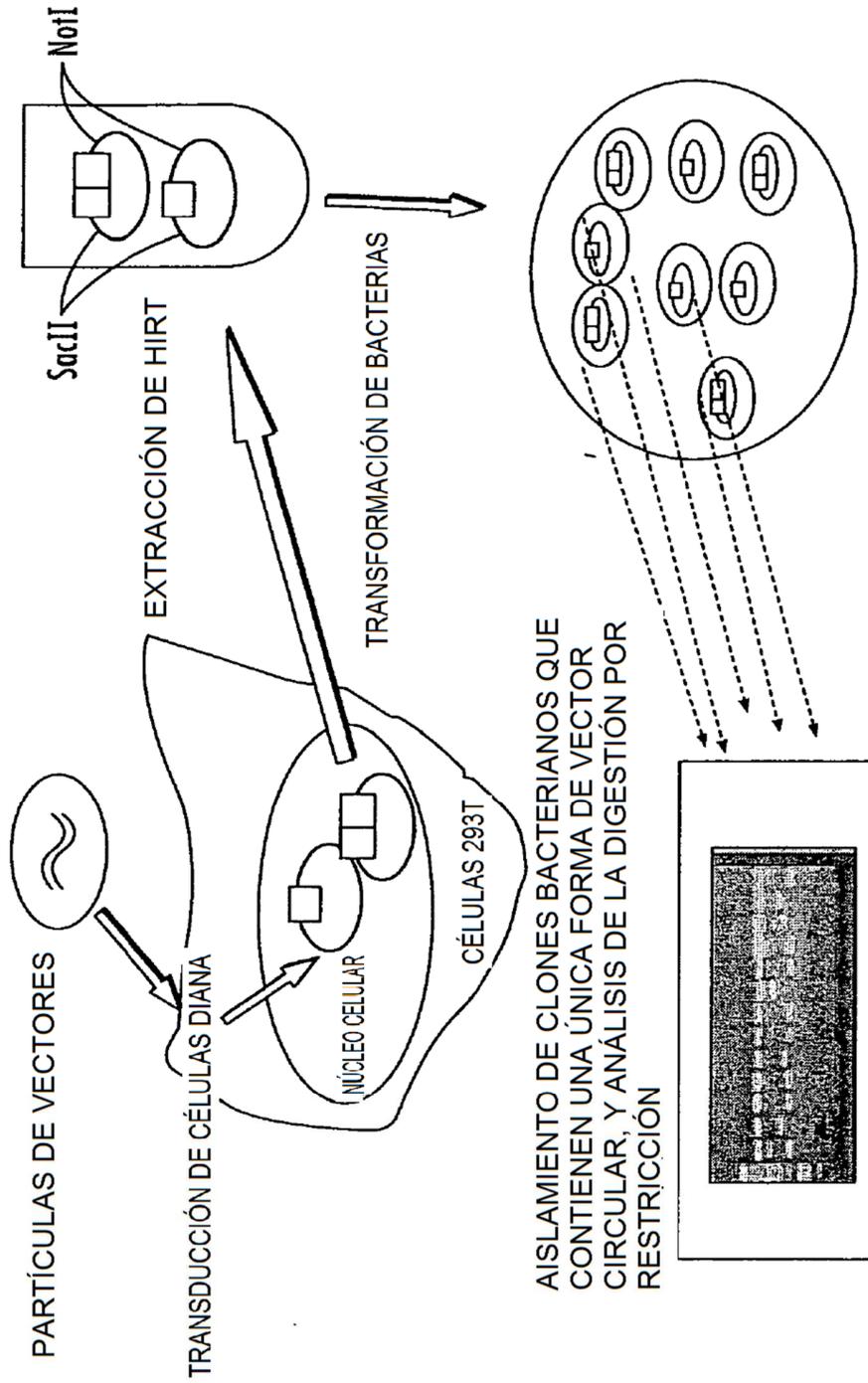


Figura 4

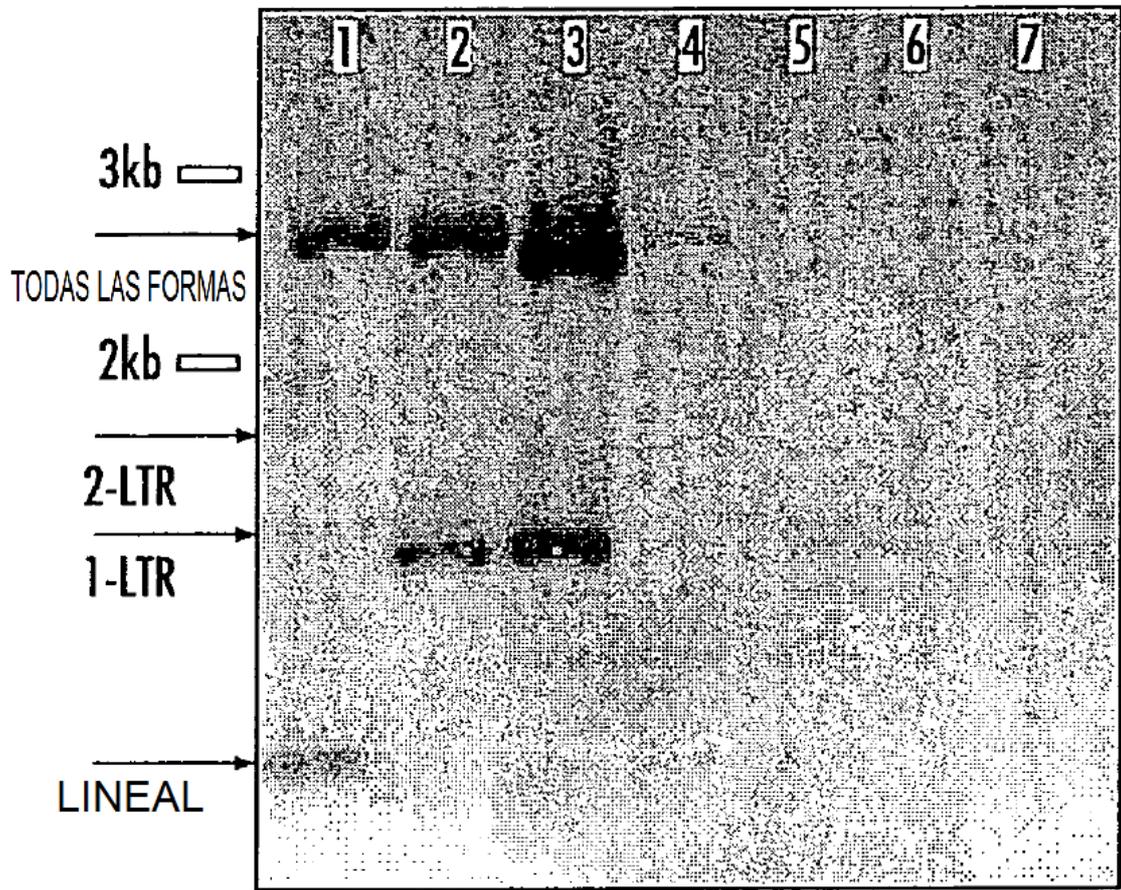


Figura 5

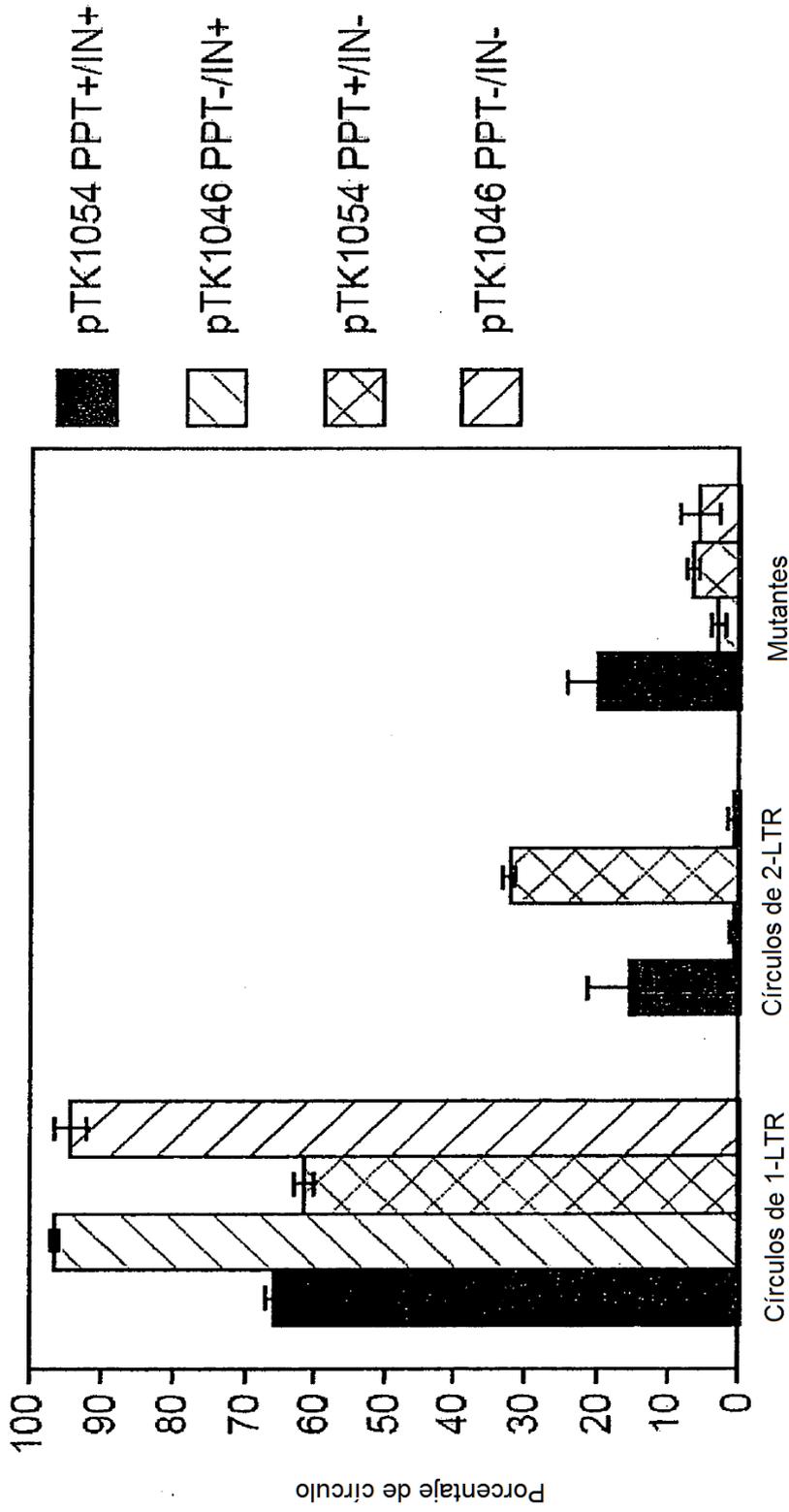


Figura 6

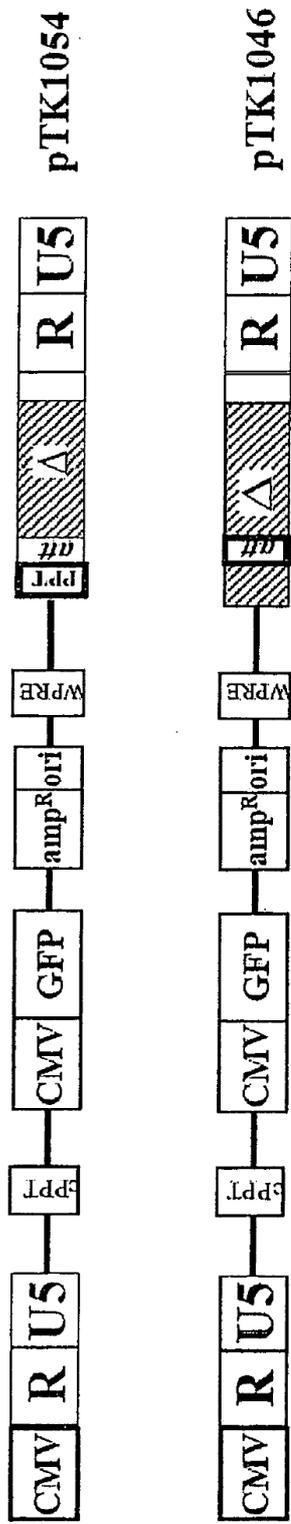


Figura 7